



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“Caracterización clínica y de los hallazgos en líquido cefalorraquídeo, de pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos, con meningitis o encefalitis viral, diagnosticados por métodos moleculares en el Hospital San Juan de Dios, en el período de enero del 2018 a junio del 2020.”

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar al grado de Especialista en Inmunología Clínica.

Silvia Araya Segura

Carné A30385

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica 2021

Dedicatoria

A Dios por ser mi sostén.

A mi mamá, mi mayor ejemplo de perseverancia y amor.

A mi esposo por todo su apoyo y paciencia en este proceso.

*A mis compañeros de la sección de Biología Molecular, especialmente a Eli, Nico y Meli,
por su acompañamiento, apoyo y ayuda en todo momento.*

Agradecimientos

*A la Dra. Natalia Solís, mi tutora, por su buena
disposición y apoyo desde el inicio de este proceso.*

A mi lectora la Dra. Lucía Figueroa, por su acompañamiento y ayuda brindada.

*A todo el personal del Laboratorio Clínico por su excelente trabajo, que es la base de esta
investigación*

Al personal del Archivo Clínico del Hospital San Juan de Dios.



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

PPEMic Programa de Posgrado en
Especialidades en Microbiología

**SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA**

ACTA-50-2021

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 24 de marzo de 2021 con el objeto de recibir el informe oral de la estudiante **Silvia Araya Segura** carné #A30385, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de **Especialista en Inmunología Clínica**. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: **Lucía Figueroa Protti, Esp.**, quien preside y lectora, **Elizabeth Rojas Cordero, MSc.**, lectora y **Natalia Solís Rojas, Esp.**, tutora.

ARTICULO 1

Quien preside solicita a la postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: **"Caracterización clínica y de los hallazgos en líquido cefalorraquídeo, de pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos, con meningitis o encefalitis viral, diagnosticados por métodos moleculares en el Hospital San Juan de Dios, en el periodo de enero del 2018 a junio del 2020"**

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan a la postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado ☒ Reprobado ☐

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 16:05 horas.

Nombre	Firma	No. Cédula
Lucía Figueroa Protti, Esp. Quien preside		113570178
Elizabeth Rojas Cordero, MSc.		106820236
Natalia Solís Rojas, MSc.		111690214
Silvia Araya Segura Estudiante		112380112

Observaciones: Mención de Honor

Tabla de Contenidos

Contenido	Página
Resumen	vii
Lista de tablas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
Capítulo 1. Marco referencial	1
1. Infecciones del SNC	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Cuadros clínicos	1
1.2.1 Meningitis	1
1.2.2 Encefalitis	2
2. Infecciones virales del SNC	2
2.1 Infecciones virales en inmunocompetentes	3
2.2 Infecciones virales en inmunosupresos	4
2.3 Etiología viral	4
3. Vigilancia y respuesta inmune del SNC	6
3.1 Vigilancia del SI	7
3.2 Respuesta del SI a infecciones del SNC	8
4. Diagnóstico de las infecciones del SNC	9
4.1 Diagnóstico de imágenes	9
4.2 Diagnóstico molecular	9
4.2.1 PCR multiplex	10
4.3 Biomarcadores	11
Antecedentes	12

Capítulo 2 Justificación y problema de estudio	15
Capítulo 3 Objetivos	17
Objetivo general y específicos	17
Capítulo 4 Metodología del estudio	18
Capítulo 5. Resultados	21
Capítulo 6. Discusión	33
Capítulo 7. Conclusiones y recomendaciones	43
Bibliografía	46
Anexos	50
Anexo 1. Cuadro de operacionalización de las variables	50
Anexo 2. Hoja de recolección de datos	55
Anexo 3. Metodología y protocolo PCR Real Time Neuro 9	57
Anexo 4. Metodología y protocolo de Film Array Biofire Meningitis	60
Anexo 5. Hoja de aval CEC, HSJD	63

Resumen

Justificación y objetivos: Las infecciones del Sistema Nervioso Central suponen un problema importante de salud. En Costa Rica, existen vacíos importantes en torno a los datos de los casos de meningitis y encefalitis de etiología viral. Aún no se conoce con certeza la incidencia de estas patologías ni la descripción etiológica ni epidemiológica de estos casos. El presente estudio tiene como objetivo caracterizar clínicamente los casos de meningitis y encefalitis virales, en población inmunocompetente e inmunosupresa, que haya sido diagnosticada por métodos moleculares en el HSJD durante un período de dos años y medio. Con esta caracterización clínica se pretende brindar un apoyo diagnóstico a los casos con sospecha de meningitis o encefalitis viral, ya que de este modo se podría realizar un abordaje de los futuros casos con más criterios basados en la evidencia local. Además, con la información que aporte la investigación, se pretende que exista un impacto sobre el uso innecesario de antibióticos de amplio espectro y pruebas de diagnóstico innecesarias.

Metodología: Se trata de un estudio retrospectivo, de tipo descriptivo, una revisión de expedientes en un período longitudinal. Todo bajo el marco bioético pertinente.

Resultados: En el estudio se analizaron 29 detecciones virales clínicamente significativas. 72,4% de los casos se diagnosticaron en pacientes con algún tipo de inmunosupresión, 55,2% de todos los casos se trataron de pacientes VIH+. Todas las causas de inmunosupresión de los pacientes estuvieron relacionadas con algún tipo de deficiencia o depleción de los linfocitos T. La cefalea, la alteración del estado mental y la fiebre fueron las manifestaciones clínicas más observadas, pero hubo diferencia entre los dos grupos estudiados. También se encontró una diferencia entre la etiología viral de los inmunosupresos e inmunocompetentes. Los virus EBV y CMV fueron los más frecuentes entre los inmunosupresos, mientras que el VZV, HSV1 y el ADV fueron los más importantes entre los inmunocompetentes. La comparación del análisis de celularidad y bioquímica del LCR entre los dos grupos de pacientes, no mostró diferencia estadísticamente significativa.

Conclusiones: Los métodos moleculares se convierten en una herramienta de diagnóstico ideal para los casos de infecciones virales en el SNC mientras se interprete con la historia clínica del paciente. Los signos y síntomas neurológicos, así como los virus detectados están íntimamente relacionados con el estado de competencia inmunológica del individuo. Los datos del análisis bioquímico y celular del LCR deben analizarse en conjunto con la clínica y los antecedentes del paciente, los resultados de este análisis no deben excluir la solicitud de detección molecular en caso de sospecha de meningitis o encefalitis viral.

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1. Clínica, epidemiología y diagnóstico de las principales etiologías virales	5
Tabla 2. Hallazgos característicos del LCR en algunas infecciones virales	11
Tabla 3. Variantes clínicas y demográficas de los pacientes con meningitis o encefalitis viral detectada por métodos moleculares en el HSJD, de enero del 2018 a junio del 2020.....	23
Tabla 4. Signos y síntomas neurológicos presentados por los pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes diagnosticados con meningitis y encefalitis viral, en el HSJD durante enero del 2018 a junio del 2020.....	25
Tabla 5. Distribución de los virus detectados en el LCR de los pacientes diagnosticados con encefalitis o meningitis viral, en el HSJD durante enero del 2018 a junio del 2020.....	26
Tabla 6. Descripción estadística de las variables bioquímicas y celulares medidas en las muestras de LCR de los pacientes diagnosticados con encefalitis y meningitis viral, en el HSJD de enero del 2018 a junio del 2020.....	30

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Esquema del tratamiento de los datos de todas las pruebas moleculares, para el diagnóstico de encefalitis y meningitis viral, realizadas de enero del 2018 a junio del 2020 en el HSJD.....	21
Figura 2. Distribución de las detecciones en pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos para cada uno de los virus detectados por métodos moleculares en el HSJD, durante el período de enero de 2018 a junio del 2020.....	27
Figura 3. Distribución de las detecciones realizadas en pacientes con encefalitis o meningitis viral, detectada por métodos moleculares en el HSJD, durante el período de enero de 2018 a junio del 2020, de acuerdo con el tipo de inmunosupresión presentada...	28
Figura 4. Porcentaje de pacientes con rangos fuera de los normales para las variables bioquímicas y celulares del análisis de líquido cefalorraquídeo, en las muestras de LCR de los pacientes diagnosticados con encefalitis y meningitis viral, en el HSJD de enero del 2018 a junio del 2020.....	31
Figura 5. Comparaciones entre los pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes, diagnosticados con encefalitis o meningitis viral, de los hallazgos bioquímicos y celulares observados en el LCR.....	32

Lista de abreviaturas

ADV	Adenovirus
CCSS	Caja Costarricense de Seguro Social
CEC	Comité Ético Científico
CMV	Citomegalovirus
CPA	Células Presentadoras de Antígenos
DM	Diabetes mellitus
EBV	Virus Epstein-Barr
EHS	Encefalitis por Virus Herpes
EV	Enterovirus
HSJD	Hospital San Juan de Dios
IRM	Resonancia Magnética
LCR	Líquido Ceforraquídeo
LES	Lupus Eritematoso Sistémico
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PL	Punción Lumbar
PMN	Polimorfonucleares
SI	Sistema Inmune
SNC	Sistema Nervioso Central
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VHS	Herpes simplex virus
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Silvia Araya Segura, con cédula de identidad 112380112, en mi condición de autor del TFG titulado "Caracterización clínica y de los hallazgos en líquido cefalorraquídeo, de pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos, con meningitis o encefalitis viral, diagnosticados por métodos moleculares en el Hospital San Juan de Dios, en el período de enero del 2018 a junio del 2020."

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI ☒ NO * ☐

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Silvia Araya Segura

Número de Carné: A30385 Número de cédula: 112380112

Correo Electrónico: assilvia@gmail.com

Fecha: 11/04/2021 Número de teléfono: 83476888

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Natalia Solís Rojas

SILVIA ARAYA
SEGURA (FIRMA)

Firmado digitalmente por
SILVIA ARAYA SEGURA
(FIRMA)
Fecha: 2021.04.11 22:26:51
-06'00'

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Capítulo 1. Marco Referencial

Las infecciones virales del Sistema Nervioso Central (SNC) suponen un problema importante de salud por su elevada incidencia y gravedad. Aun considerando que en la mayoría de los casos tienen un carácter benigno y limitado en el tiempo, por su condición de enfermedad transmisible, su capacidad de provocar brotes epidémicos y el posible desenlace fatal o secuelas que originan pueden alcanzar una gran repercusión social (1). Muchas de las características clínicas y diagnósticas de los cuadros virales del SNC se deben a la vigilancia y la respuesta del Sistema Inmune (SI), por este motivo es de vital importancia comprender y analizar el papel de éste en las infecciones virales del SNC.

1. Infecciones del Sistema Nervioso Central

1.1 Generalidades

Las infecciones del SNC son una urgencia médica, que abarca desde las meninges, el encéfalo y el espacio que existe entre ellas. Pueden ser de origen viral, bacteriano, fúngico o parasitario. Ocurre en cualquier etapa de la vida, con una evolución rápidamente progresiva y con una alta probabilidad de causar daños permanentes, e incluso la muerte si no es tratado oportunamente (2).

Las infecciones del SNC se clasifican de acuerdo al espacio afectado, meninges (meningitis), el parénquima cerebral (encefalitis o lesión masiva del cerebro) o la médula espinal (mielitis) según el sitio anatómico predominante de la infección (3). En general, los cuadros infecciosos del SNC con frecuencia se superponen, lo que lleva a diagnósticos clínicos de meningoencefalitis o encefalomielitis. Sin embargo, las definiciones sindrómicas siguen siendo útiles, ya que muchas etiologías se asocian característicamente con un síndrome más que otros debido al tropismo viral (4).

1.2 Cuadros clínicos

1.2.1 Meningitis

La etiología de las meningitis es diversa, con mayor incidencia de las de origen viral, con un curso más benigno, por lo que son menos estudiadas (2).

En la práctica común, la meningitis se refiere específicamente a la inflamación de las

membranas protectoras del cerebro y la médula espinal, conocidas colectivamente como las meninges (4). Los síntomas clásicos de la meningitis son fiebre, dolor de cabeza, rigidez en el cuello, fotofobia y ocasionalmente cambios en el estado mental, pero este síndrome puede presentarse de manera atípica en el huésped inmunocomprometido (3). La meningitis bacteriana aguda generalmente se caracteriza por fiebres altas y una disminución rápida del estado neurológico en ausencia de antibióticos de rápida administración. La meningitis viral aguda, por otro lado, generalmente es más insidiosa en su inicio, con aparición de síntomas durante días en lugar de horas. Las manifestaciones extraneurológicas pueden estar presentes en la meningitis viral (3).

1.2.2 Encefalitis

La clínica de las encefalitis se diferencia de las meningitis por la existencia de alteraciones de las funciones cerebrales superiores (1).

La encefalitis se caracteriza por dolor de cabeza, fiebre y estado mental alterado debido a la inflamación del parénquima cerebral. Las convulsiones, los cambios de comportamiento, la alteración del lenguaje y los signos neurológicos focales son una parte común y prominente del síndrome (4). No todas las encefalitis son infecciosas; sin embargo, los virus son la causa más comúnmente identificada de encefalitis aguda. En general, hay más de 100 agentes patógenos capaces de causar encefalitis. El virus del herpes simplex (VHS) es la etiología más comúnmente identificada de la encefalitis viral en los países desarrollados (5).

2. Infecciones virales del SNC

Los virus pueden dañar cualquier parte del sistema nervioso central (SNC) y causar enfermedades neurológicas agudas y crónicas. Los virus constituyen la causa infecciosa más común de encefalitis, meningitis aséptica y mielitis (4).

Como con cualquier proceso infeccioso, las manifestaciones de la enfermedad están determinadas por factores microbianos y del huésped. Los factores virales, como la invasividad, la virulencia, la latencia y la reactivación, ayudan a determinar el inicio y gravedad de la enfermedad. El tropismo viral para tejidos específicos puede explicar la localización dentro del SNC, así como otros sistemas de órganos. Los factores del huésped

juegan un papel igualmente importante, ya que la edad, la inmunidad y el estado de exposición contribuyen al riesgo de infecciones virales específicas del SNC en cualquier individuo (4).

La mayoría de los virus que infectan el SNC son capaces de causar meningitis o encefalitis, pero típicamente un virus en particular mostrará una tendencia a causar un síndrome más que el otro (6).

2.1 Infecciones virales del SNC en inmunocompetentes

Se estima que la incidencia de meningitis viral en la población general es de entre 5 a 17 casos por cada 100.000 habitantes/año, en los países del primer mundo. Y son la principal causa de las denominadas meningitis asépticas (1).

La lista de virus que pueden provocar infección del SNC en personas sanas es muy amplia. En el caso de las meningitis, hay causas comunes en todo el mundo, como los enterovirus no poliomielíticos. Éstos llegan a provocar alrededor del 86% de las meningitis en la población general y hasta más del 60% en niños menores de 3 años (1). Respecto a las encefalitis en población inmunocompetente, en Asia, el virus de la encefalitis Japonesa (VEJ) es el agente infeccioso identificado con mayor frecuencia. Las etiologías en Europa, se manifiestan con Virus Herpes Simplex (VHS) y Varicela Zoster (VZV) como los agentes más frecuentes, al igual que en América, adicionando además los enterovirus y arbovirus en estos países (7).

Al desarrollar la patogénesis en el SNC de las infecciones virales, en personas inmunocompetentes, se conoce que, aunque los virus rompen las barreras protectoras de varias maneras diferentes, en inmunocompetentes utilizan especialmente dos rutas principales de ingreso al SNC. Una ruta de entrada es a través del suministro de sangre. Como una segunda ruta principal de entrada al SNC, algunos virus infectan y migran a través de los nervios periféricos. Si bien el virus de la rabia infecta inicialmente los miocitos después de una mordedura de un animal infectado, y el poliovirus infecta las células epiteliales de la mucosa después de la ingestión, ambos usan neuronas motoras periféricas para llegar al SNC (8).

2.2 Infecciones virales del SNC en inmunosupresos

Los factores del huésped, como la edad, el estado inmunitario y la exposición, contribuyen al riesgo y la gravedad en los huéspedes individuales. Las fuentes de inmunocompromiso, como infección avanzada por virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), medicamentos inmunomoduladores, trasplante de órganos sólidos o células hematopoyéticas y trastornos de inmunodeficiencia primaria, pueden predisponer a los pacientes a enfermedades víricas específicas (4). En las últimas décadas, la población de pacientes inmunocomprometidos ha aumentado, se estima que en Estados Unidos alcanza un 3% de la población total (9). Las razones de este fenómeno son, entre otros, los éxitos del manejo del trasplante, las mejoras en el manejo de los pacientes con cáncer hematológico y el uso de nuevos fármacos inmunosupresores en pacientes con enfermedades autoinmunes (9).

Las infecciones oportunistas del SNC a menudo requieren ingreso en una Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), principalmente debido a un estado mental alterado, convulsiones o complicaciones médicas. Además, estas infecciones están asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas. La epidemiología de las infecciones oportunistas del SNC difiere según el tipo y la causa de la inmunosupresión (9).

Además, es importante reconocer que: (a) las presentaciones clínicas de infecciones en pacientes inmunocomprometidos pueden ser atípicas o simular procesos no infecciosos, (b) pueden coexistir dos o más enfermedades dispares, y (c) los pacientes pueden estar en riesgo de infección no solo durante el tratamiento del cáncer o el procedimiento de trasplante, sino también antes y durante un período prolongado después de la terapia o el trasplante (10).

2.3 Etiología viral

Se pueden usar muchas pistas para determinar el agente causal de la encefalitis o meningitis, incluida la ubicación geográfica, el historial de exposición como el de un insecto o animal y síndromes clínicos únicos. Sin embargo, se estima que hasta en el 50% de los casos de encefalitis y hasta el 60% de los casos de meningitis, la etiología no está identificada (6). Por cuestiones prácticas, solo se desarrollarán en la siguiente tabla las principales características de los virus contenidos en la metodología del trabajo. Es decir, de los virus que están comprendidos en los paneles de detección molecular que se incluyeron en los resultados del estudio.

Tabla 1. Clínica, epidemiología y diagnóstico de las principales etiologías virales que causan cuadros infecciosos del SNC.

Virus	Características clínicas	Epidemiología	Diagnóstico de elección	Fuente
<i>Herpes simplex 1y2</i>	Fiebre alta, cambios de comportamiento, disfasia, amnesia, hemiparesia; afectación menos frecuente del tronco encefálico; convulsiones comunes; meningitis aséptica (incluida recurrente es común con HSV-2).	HSV-1 es el agente más frecuente de encefalitis viral esporádica en los Estados Unidos, Europa y Australia. Es global, causa esporádica más común; todo el año HSV-2 en neonatos y HSV-1 en adultos.	Amplificación de ácidos nucleicos en LCR.	(4,11).
<i>Varicela Zoster</i>	Cerebelitis en niños (por lo general de auto resolución); encefalitis focal, vasculopatía y accidente cerebrovascular después de la erupción de zoster.	Es la segunda causa más común de encefalitis y la segunda causa más común de meningitis viral en los países desarrollados. La reactivación en adultos es debido a inmunocompromiso (especialmente VIH).	Amplificación de ácidos nucleicos en LCR y suero. IgG e IgM en LCR y suero.	(1,4,12)
<i>Enterovirus</i>	Encefalitis no específica, puede causar rombencefalitis, síndrome similar a la poliomielitis.	Global; meningitis aséptica bastante común (especialmente lactantes), encefalitis menos frecuente, pero causa relativamente común; finales de verano-principios de otoño; y en todas las edades.	Amplificación de ácidos nucleicos en LCR.	(1,4).
<i>HHV6</i>	Estado mental alterado, encefalitis límbica, convulsiones; fiebre es rara.	Global, alta seroprevalencia; todo el año; la reactivación es común en pacientes con trasplante de células madre hematopoyéticas, pero rara vez causa encefalitis en inmunocompetentes.	Amplificación de ácidos nucleicos en LCR.	(1,4,7).
<i>Adenovirus</i>	Neumonía previa o concurrente; encefalitis más común que meningitis; sin síndrome específico.	Causa global, esporádica, rara, todo el año; niños; inmunocompromiso, especialmente en trasplante de células madre.	Hisopo nasofaríngeo directo y cultivo o PCR u otras muestras respiratorias	(1,4).

<i>Parvovirus B19</i>	Enfermedad febril aguda, acompañada de eritema infeccioso. El virus puede producir cuadros de encefalitis y meningitis.	Meningitis y meningoencefalitis tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunocomprometidos.	Amplificación de ácidos nucleicos en LCR y sangre total.	(13).
<i>CMV</i>	La enfermedad de CMV de inicio tardío también incluye retinitis y encefalitis como complicaciones poco frecuentes.	Global, esporádico; todo el año; enfermedad del SNC generalmente debido a la reactivación en inmunocomprometidos (VIH en particular).	Amplificación de ácidos nucleicos en LCR y suero. IgG e IgM en LCR y suero.	(1,4,12).
<i>EBV</i>	Puede presentarse como meningitis, encefalitis o mielitis inespecíficas. La reactivación del EBV también puede ocurrir en respuesta a la infección con un patógeno alternativo.	Global, esporádico; causa infrecuente; todo el año; incidencia de afectación del SNC varía de 0.7% a 5% en pacientes inmunocompetentes, con una mayor incidencia en individuos inmunocomprometidos.	Amplificación de ácidos nucleicos en LCR. Anticuerpos EBV, IgG e IgM, EBNA VCA en LCR y suero.	(1,4,12).

3. Vigilancia y respuesta inmune del SNC

El sistema nervioso central se considera un sitio inmune privilegiado debido a diversas afecciones específicas. Primero, la expresión de las moléculas de MHC está limitada dentro del parénquima del SNC. En segundo lugar, la entrada de células inmunes adaptativas en el SNC a través de la barrera hematoencefálica y el líquido cefalorraquídeo está restringida. Tercero (y quizás lo más importante), la representación antigénica del SNC en los ganglios linfáticos periféricos puede no recapitular fielmente el repertorio antigénico del SNC debido a características especiales del drenaje "linfático" del SNC. Como resultado, el sistema inmune adaptativo podría ignorar numerosos antígenos que se expresan en el parénquima del SNC (14).

Los hallazgos de los últimos 5 años han cambiado mucho el paradigma de sitio "inmunoprivilegiado" que siempre ha ostentado el SNC. A continuación, se desarrollarán los conceptos de vigilancia y respuesta inmune a infecciones virales del SNC.

3.1 Vigilancia del SI en el SNC

Las meninges, el parénquima del SNC y el sistema ventricular tienen componentes estructurales vasculares distintos que pueden limitar la entrada de ciertos patógenos y subconjuntos de leucocitos particulares, al tiempo que proporcionan señales de localización que promueven las interacciones de las células inmunes (15).

Los vasos parenquimatosos del SNC tienen especializaciones que proporcionan una barrera a los patógenos, las células y las moléculas grandes transmitidas por la sangre. La membrana aracnoide meníngea y las células epiteliales del plexo coroideo ventricular tienen uniones estrechas intercelulares, que comprenden las claudinas 1, 2 y 3, que ayudan a restringir la invasión de patógenos en el parénquima del SNC. El LCR circula por todo el sistema ventricular y el espacio subaracnoideo de las meninges a través de las aberturas entre estos compartimentos, lo que permite la detección de patógenos a través del muestreo de LCR meníngeo (15).

Aunque la migración de las células inmunes al SNC está estrechamente regulada debido a la barrera hematoencefálica, existen rutas que los leucocitos periféricos pueden utilizar para ingresar al LCR, el plexo coroideo (PC), las meninges, espacios perivasculares, y eventualmente el tejido parenquimatoso (16). Originalmente se pensaba que era inmunológicamente inaccesible, ahora se acepta que las células inmunes están presentes en las meninges y proporcionan vigilancia inmunológica del SNC. Asimismo, se descubrieron vasos linfáticos clásicos en las meninges del SNC. Los nuevos hallazgos proporcionan un mecanismo por el cual las partículas grandes y las células inmunes pueden drenar del cerebro e interactuar directamente con el sistema inmunitario periférico. Las propiedades únicas de estos vasos, incluida su ubicación y tamaño, pueden explicar por qué las respuestas inmunes a los antígenos del SNC a menudo son más lentas que en los tejidos periféricos. Además, este descubrimiento sugiere que los ganglios linfáticos cervicales profundos pueden estar íntimamente involucrados tanto en la tolerancia a los autoantígenos como en las respuestas inmunes contra los antígenos extraños. Las células endoteliales linfáticas de los vasos linfáticos meníngeos pueden estar equipadas molecularmente de manera única para garantizar la tolerancia de las células T reactivas a los antígenos derivados del SNC (17).

Las células centinelas inmunes innatas especializadas están estacionadas en cada una de estas ubicaciones y se denominan convenientemente: macrófagos meníngeos, macrófagos

perivasculares, macrófagos y microglía: los macrófagos residentes del SNC. Estas células proporcionan una vigilancia crítica del SNC en condiciones de estado estacionario y son las primeras células en detectar patógenos extraños o daños en los tejidos e iniciar una intervención inmunológica (16). La microglía es la población de macrófagos residente del SNC donde la infiltración de monocitos y linfocitos periféricos es limitada. Estas células se encuentran inactivas en el SNC, es decir, son incapaces de realizar funciones efectoras y de presentación de antígenos hasta que se activan por una lesión o infección (18).

3.2 Respuesta del SI ante una infección viral

Los estudios en animales y humanos han demostrado que tanto las respuestas inmunes innatas como el tráfico de linfocitos al SNC son mecanismos importantes de control vírico (15). Aunque es importante montar una respuesta inmune contra los patógenos y lesiones del SNC, es igualmente importante contrarrestar la inflamación con potentes mecanismos inmunorreguladores. No hacerlo puede resultar en el desarrollo de inmunopatología severa y la incapacidad de restaurar la homeostasis del SNC (16). Para muchos virus neurotrópicos, la citopatología viral juega un papel importante en la disfunción del SNC. Sin embargo, los modelos animales experimentales han revelado que la respuesta inmune antiviral también puede, en ciertas condiciones, ser un contribuyente activo a la enfermedad (8).

Una vez que el tropismo viral permite el paso al SNC, la infección se caracteriza por la liberación de quimioatrayentes en las meninges, seguida de la consiguiente infiltración de células inmunes: neutrófilos, monocitos y linfocitos CD8+ (17).

Las respuestas inmunes innatas también inducen la expresión de mediadores inflamatorios, que pueden ejercer influencias específicas de células y regiones sobre la función cerebral. Por lo tanto, los eventos inflamatorios iniciales durante la neuroinvasión del patógeno a menudo se asocian con signos clínicos que no solo identifican el sitio de infección del SNC sino que son el resultado de eventos fisiopatológicos que afectan la función de la barrera hematoencefálica, el metabolismo cerebral, el consumo de oxígeno y la sangre (15). Entre esos eventos, la producción temprana de IFN-I es fundamental para controlar la propagación de las infecciones virales del SNC y a menudo promueve la supervivencia del huésped (16).

La infiltración de neutrófilos en estos compartimentos es crítica para la eliminación del patógeno, pero conduce a los signos clínicos de meningitis, una tríada clásica de dolor de cabeza, rigidez de cuello (meningismo) y fotofobia. Estos signos son el resultado de la expresión de catecolaminas por los fagocitos expuestos a productos microbianos, lo que promueve la midriasis, lo que lleva a una transferencia excesiva de luz al cerebro y al vasoespasmo (15).

Después de la infección del SNC, las células inmunes innatas (monocitos, neutrófilos) y adaptativas (células T CD8 +, células T CD4 +, células B) se reclutan en el sistema nervioso central donde participan en la contención/eliminación de patógenos(19).

4. Diagnóstico de las infecciones del SNC

Para un tratamiento efectivo de cualquier infección, identificar el organismo causal es la parte más crucial del régimen de tratamiento (20). A diferencia del diagnóstico de las meningitis bacterianas, en el que el estándar de oro reside en el cultivo del LCR, en las infecciones virales del SNC provocadas por virus, el cultivo presenta bajo rendimiento, y se ha sustituido por las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos que en la actualidad son el método de referencia para el diagnóstico de estas infecciones (1).

El reconocimiento de los virus que infectan a los humanos está aumentando constantemente, pero aún es incompleto. Más del 95% de las infecciones del SNC permanecen sin diagnosticar internacionalmente. Estos casos con sospecha de etiologías virales dificultan la interpretación de resultados negativos. En consecuencia, los médicos solo pueden usar resultados negativos con confianza moderada para descartar la infección del SNC (20).

La serología complementa el diagnóstico molecular al proporcionar información sobre el historial de exposición a patógenos de un sujeto. Puede evaluar la relevancia de un descubrimiento realizado utilizando métodos moleculares al indicar si una infección se correlaciona temporalmente con el inicio de la enfermedad. La serología también puede ayudar a dirigir la investigación molecular (21). La detección de anticuerpos específicos de inmunoglobulina M (IgM) en el LCR puede sugerir fuertemente la invasión del SNC, que a su vez acelera el tratamiento de muchas infecciones virales en las primeras etapas de la enfermedad (20).

4.1 Diagnóstico por medio de imágenes

Las imágenes del cerebro son el primer paso en el estudio de una posible infección del SNC. El objetivo principal de las imágenes cerebrales es descartar lesiones que ocupan espacio como abscesos, tumores, edemas o hidrocefalia que pueden conducir a una hernia cerebral durante la punción lumbar (PL). Las imágenes del cerebro deben realizarse antes de la PL diagnóstica (12,20).

4.2 Diagnóstico molecular

Desde la introducción de técnicas moleculares en laboratorios de diagnóstico, la detección viral se ha transformado y cambiado por completo. Los métodos moleculares tienen numerosas ventajas sobre los métodos convencionales, incluyendo alta sensibilidad, confiabilidad y rapidez ya que los resultados están disponibles en un período muy corto (máximo de 72 h desde la recolección de la muestra). Por lo tanto, son de gran valor para el manejo del paciente (20).

Los ensayos moleculares empleados en microbiología clínica incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación isotérmica, microarrays de ADN, hibridación *in situ* y secuenciación (21). La PCR es el método más importante para detectar infecciones virales del SNC (22). La PCR no solo tiene una alta sensibilidad sino también la capacidad de detectar organismos no cultivables viables o fastidiosos. Dichas técnicas ofrecen una ventaja particular en el diagnóstico de infecciones virales del sistema nervioso central donde la PCR no solo ha mejorado la sensibilidad diagnóstica, pero también expandió el fenotipo clínico de varias infecciones virales (23). Hay muchos tipos de PCR para la detección viral en LCR, sin embargo para el alcance de los objetivos de esta investigación solo se desarrollará la PCR Multiplex.

4.2.1 PCR Multiplex

La PCR multiplex utiliza la tecnología de PCR convencional, pero contiene cebadores y sondas para varios patógenos, por lo que muchos pueden analizarse al mismo tiempo. Estandariza las pruebas y reduce la necesidad de preselección por parte del médico y mejora la detección de patógenos en comparación con las pruebas de PCR individuales (24). Los ensayos moleculares multiplex son una opción atractiva para la detección de

varios objetivos microbianos simultáneamente y ahora se usan de forma rutinaria para infecciones del torrente sanguíneo, respiratorias y gastrointestinales (25).

4.3 Biomarcadores

Los biomarcadores se refieren a los hallazgos bioquímicos y celulares analizados en el LCR del paciente. Una vez que se descarta la lesión que ocupa el espacio, el siguiente paso es la punción lumbar diagnóstica (12). El patrón típico de LCR consistente con infecciones virales es: la proteína total levemente elevada o normal, glucosa normal y pleiocitosis linfocítica moderada. Sin embargo, hay algunas excepciones al patrón típico (4).

Los hallazgos característicos del LCR en algunas infecciones virales del SNC se describen en el Tabla 2, pero la ausencia de esos hallazgos no descarta una infección particular si la sospecha clínica es alta (12).

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) a veces predominan entre los primeros perfiles de LCR; sin embargo, este fenómeno se desplaza hacia un predominio mononuclear (por ejemplo, linfocitos) dentro de las 18-48 horas posteriores al examen inicial. Si bien las concentraciones de proteínas generalmente están elevadas en el rango de 40 a 3704 mg / dL, los valores de glucosa pueden ser bajos a normales, en un rango de 32 a 80 mg/dL. Las concentraciones de lactato en LCR son normales en la meningitis viral (26).

Tabla 2. Hallazgos característicos del LCR en algunas infecciones virales.

Infección Viral CNS	Método diagnóstico de preferencia	Hallazgos específicos en el LCR
HSV 1 y 2	PCR en LCR	Leucocitos: aprox. 100 céls/mL, eritrocitos pueden estar elevados, proteínas: 100mg/dL o más.
CMV	PCR en LCR	Leucocitos y proteínas posiblemente elevadas. Eritrocitos ausentes. Glucosa puede estar disminuida.
Enterovirus	PCR en LCR	Leucocitos y proteínas elevadas la mayoría de las veces.
Virus Encefalitis Japonesas	Serología en suero y LCR	Leucocitos: aprox. 200 céls/mL, eritrocitos ausentes, glucosa normal, proteínas elevadas hasta 900 mg/dL en West Nile Virus.

Fuente: Bookstaver et al., 2017

5. Antecedentes

En general, el tratamiento de datos alrededor de los cuadros de encefalitis y meningitis viral en la población adulta es menos conocida que en la pediátrica, ya que la mayoría de los estudios se han realizado en niños.

En la actualidad, la mayoría de estudios clínicos se desarrollan alrededor de los enterovirus, los virus herpes y los arbovirus; que se han descrito como los principales agentes etiológicos de la población inmunocompetente, sin embargo, su distribución es muy variable y no del todo conocida ya que la mayoría de las publicaciones de infecciones virales del SNC en la población adulta, se han realizado en base a brotes epidémicos (27).

Las variaciones que se encuentran en los signos y síntomas de los cuadros de encefalitis y meningitis de distinta etiología viral, son muy pocas cuando se analizan los estudios que se han realizado a nivel mundial. Éstos son encabezados por cefalea, fiebre, náusea y rigidez nuchal en todos los casos (22,28–31). Sin embargo, la alta morbilidad y mortalidad de la meningitis infecciosa, la encefalitis y la meningoencefalitis y la baja especificidad de sus signos y síntomas clínicos han llevado a una serie de estudios cuyo objetivo es generar modelos de predicción para la presencia de meningitis infecciosa y/o encefalitis. A pesar de estos esfuerzos, la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas (ESCMID) y el Grupo de Estudio Europeo para Infecciones del Cerebro ESGIB concluyeron que ninguno de los algoritmos de diagnóstico publicados era confiable para identificar pacientes con meningitis infecciosa y / o encefalitis en pacientes adultos tras la validación en cohortes independientes. Lo más importante es que sostienen que la presencia de estas infecciones no se puede probar sin un examen del líquido cefalorraquídeo (32).

Cuando se analiza la etiología viral de las meningitis en la población general la causa principal a nivel mundial son los enterovirus, seguido por los herpesvirus principalmente HSV-1 y VZV. Si hablamos de las causas de encefalitis viral la causa más importante son los herpesvirus, especialmente el virus Herpes Simplex y VZV; tal y como se resume de varios estudios epidemiológicos a nivel mundial (7,11,27,30,33,34).

La clínica y epidemiología de las infecciones virales del SNC en pacientes inmunosupresos es bastante variable, difiere según el tipo y la causa de la inmunosupresión, como se comentó en la sección 2.2 del Marco Referencial. Sin embargo, existen algunos estudios que comparan el comportamiento de estas infecciones en pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes.

Adentrándose un poco más en los antecedentes relacionados con los análisis celulares y bioquímicos de LCR, encontramos un estudio retrospectivo de 11 años, en donde se analizaron 2604 pacientes adultos con cuadros virales del SNC y tomando como base la teoría de que, el recuento de células en el LCR y la concentración de proteínas en LCR pueden reflejar el grado de inflamación y el mecanismo del daño cerebral. Se compararon las concentraciones de proteína y el recuento de células en el LCR, con los principales diagnósticos clínicos y los hallazgos virológicos. En los resultados, todos los grupos clínicos mostraron concentraciones de proteína similares, los pacientes con presentaciones consideradas típicas para las enfermedades inflamatorias del SNC y los pacientes con otras enfermedades inflamatorias del SNC mostraron mayores recuentos de células del LCR que los pacientes con condiciones de inmunodeficiencia y los pacientes con enfermedades neurológicas adicionales. Al comparar el análisis de LCR en las distintas etiologías virales, no se encontró una relación clara entre las distintas infecciones y la concentración de proteína en LCR. Sin embargo, el recuento de células en LCR fue claramente más alto en la infección por Enterovirus y más bajo entre los pacientes con infección por EBV. (22).

Los estudios comentados y otros similares demuestran la gran variabilidad que existe entre las conclusiones a las que llegan los distintos investigadores, respecto a las relaciones de la detección molecular del patógeno viral y el análisis del LCR. Como se puede observar, son diversos y ambiguos en muchos casos. No hay un patrón que ligue los hallazgos en la población inmunosupresa y tampoco en la inmunocompetente. Este cuestionamiento llevó a los investigadores del estudio más reciente sobre el tema, publicado en abril del 2020 a tratar de determinar predictores independientes de la detección de patógenos infecciosos en pacientes adultos que presentan meningitis, encefalitis o meningoencefalitis.

El estudio identificó una disminución de la proporción de glucosa, como el único predictor independiente de infecciones en pacientes adultos con meningitis y/o encefalitis. Y respecto a las infecciones virales propiamente, las células mononucleares en el LCR aumentadas fueron los únicos predictores consistentes. Los análisis uni y multivariantes revelaron que los datos del LCR fueron los únicos predictores independientes y discriminatorios de la presencia de una infección en este contexto. Estos hallazgos agregan credibilidad al limitado cuerpo de evidencia que demuestra que los datos de análisis tempranos de LCR antes del trabajo microbiológico en una cohorte de pacientes adultos con meningitis y / o encefalitis proporcionan información diagnóstica importante (32).

Desarrollando un poco el tema a nivel de Latinoamérica, sobresalen mayoritariamente investigaciones epidemiológicas de meningitis virales relacionadas con Enterovirus y algunos Arbovirus únicamente (33,35–37), no existen estudios que exploren otros datos de relevancia para la presente investigación.

En Costa Rica, las infecciones virales del SNC se consideran de reporte obligatorio por parte del Ministerio de Salud. La última estadística Nacional que se tiene es del año 2015, en donde se registran 22 casos de muerte causados por meningitis viral y 1 por encefalitis viral (38). En Costa Rica, no existe ningún estudio reciente que explore los datos clínicos y microbiológicos de encefalitis o meningitis virales en adultos. De hecho, el antecedente a nivel local que se pudo analizar anecdóticamente, fue un estudio realizado en 1969 en el Hospital San Juan de Dios, donde se analizan 116 casos de meningitis diagnosticados de 1964 a 1969, en donde destaca un total de 16 casos por etiología viral, cuyo análisis de LCR determinó un predominio linfocítico en 88% de éstos y una concentración de glucosa normal en 100% de éstos (39). Los otros estudios que existen a nivel local son en población pediátrica, propiamente estudios del Hospital Nacional de Niños (HNN), en uno de éstos se abarcan las meningitis con una tinción negativa de líquido cefalorraquídeo en el período del 2005 al 2010. Destacándose en éste tal y como se espera epidemiológicamente que la mayoría de los virus que se detectaron fueran enterovirus (31). El otro estudio con características similares presenta el perfil epidemiológico de los pacientes con infecciones por Enterovirus en el SNC durante marzo del 2013 a mayo del 2015. En éste se incluyeron 72 pacientes de los cuales un 83% presentó meningitis aguda, se documentaron 4,1% de pacientes con complicaciones y respecto a la distribución etaria, la mayoría de los casos se presentaron en neonatos y lactantes menores (40).

Sin embargo, como se mencionó anteriormente en Costa Rica y en Centroamérica no existen estudios en adultos que analicen variables relacionadas con los cuadros en estudio.

Capítulo 2. Justificación y problema de estudio.

2.1 Justificación del estudio

En general, los estudios que caracterizan a los pacientes con infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC) causadas por virus son pocos en Costa Rica, y a nivel de Centroamérica también. Respecto a este tipo de infecciones virales, no se tienen datos actualizados sobre la afectación en la población adulta de Costa Rica. No se conocen los agentes causales principales, la epidemiología o la presentación clínica de estos cuadros.

Adicionalmente, es importante agregar que, a nivel internacional existen escasos estudios que comparen los pacientes inmunosupresos y los inmunocompetentes respecto a las características epidemiológicas, clínicas y de factores de la respuesta inmune en encefalitis o meningitis virales. Hay muchos estudios realizados en pacientes únicamente inmunocompetentes o solamente estudiando inmunosupresos, pero comparaciones de estas dos poblaciones en un mismo estudio con condiciones experimentales similares son escasas. Esta comparación sería un aporte importante a la literatura científica.

La falta de datos e información sobre las meningitis y encefalitis de etiología viral evidencia el gran subregistro que se cree que existe de estos casos, por no contar con las herramientas diagnósticas adecuadas en el sistema de salud costarricense. Además, este vacío puede tener una afectación importante en los pacientes ya que las infecciones del SNC pueden ser extremadamente graves y potencialmente mortales, con un resultado neurológico impredecible (4).

Para un tratamiento efectivo de cualquier infección, identificar el organismo causal es la parte crucial del régimen de tratamiento. Los médicos solicitan diferentes pruebas de laboratorio solo para identificar el microorganismo responsable de la infección. Una vez que se identifica el organismo, el tratamiento se vuelve más fácil. En el entorno clínico, el diagnóstico rápido de estas infecciones tiene muchas ventajas, como evitar el trabajo de diagnóstico extenso, innecesario y el sobretratamiento. El diagnóstico temprano de estas infecciones puede acortar el tiempo de hospitalización y también reduce los costos de la atención médica (24).

Este estudio va a aportar información de suma importancia en el abordaje de los pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos con sospecha de meningitis o encefalitis. De esta manera, la sospecha de meningitis aséptica o encefalitis viral se podría realizar con criterios basados en la evidencia de casos anteriores. De este modo, se pueden obtener múltiples beneficios para el paciente y para la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS). Se evitaría el inicio y el mantenimiento de terapias innecesarias de antibióticos de amplio espectro, que por un lado pueden ocasionar comorbilidades, como por ejemplo diarrea por *Clostridium difficile*. También sería una medida que, a largo plazo, contribuiría con la disminución de la resistencia a los antimicrobianos. Otro aspecto asociado es que la CCSS no cuenta con algunos medicamentos antivirales que se utilizan en el tratamiento de estas afecciones. Por ejemplo, Cidofovir para tratar casos de Adenovirus. Con esto, si la presente investigación evidencia la detección de este tipo de virus, sería esencial para el paciente la adquisición de esta terapia para su tratamiento.

En el caso de los pacientes con inmunosupresión, las infecciones oportunistas del SNC están asociadas con una morbilidad y mortalidad significativas. En las últimas décadas, la población de pacientes inmunocomprometidos ha aumentado (21). El presente estudio actualizará al personal médico con este enfoque diagnóstico para tratar oportunamente y prevenir en algunos casos estas infecciones por medio de los datos clínicos y epidemiológicos de los pacientes inmunosupresos que han cursado con estas infecciones.

2.2 Problema de investigación.

¿Cuáles son las características clínicas y de los hallazgos en líquido cefalorraquídeo de los pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos, diagnosticados por medio de técnicas moleculares, con meningitis o encefalitis virales, en el Hospital San Juan de Dios, en el período de enero del 2018 a junio del 2020?

Capítulo 3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Caracterizar las variables clínicas y los hallazgos en LCR de pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos diagnosticados por medio de técnicas moleculares, con una meningitis o encefalitis viral en el Hospital San Juan de Dios, durante el período de enero del 2018 a junio del 2020.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Determinar los principales signos y síntomas neurológicos que presentaron los pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos con meningitis o encefalitis de etiología viral, de la población en estudio.

3.2.2. Describir el perfil demográfico y clínico de la población en estudio.

3.3.3. Detallar la etiología viral de las meningitis y encefalitis detectadas por métodos moleculares, en el grupo de los pacientes inmunosupresos y en el grupo de los inmunocompetentes, de la población es estudio.

3.2.4. Describir mediante indicadores estadísticos, el análisis de los hallazgos que se obtuvieron del LCR de los pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes, con encefalitis o meningitis viral, detectada por métodos moleculares en el HSJD durante el período en estudio.

Capítulo 4. Metodología del estudio

4.1 Diseño del estudio

La investigación se desarrolló bajo un marco de estudio observacional, retrospectivo, de tipo descriptivo, es una revisión de expedientes en un período longitudinal.

4.2 Población y muestra

La población estudiada fue el número total de personas mayores de 13 años, de ambos sexos, atendidos en el Hospital San Juan de Dios con diagnóstico de meningitis o encefalitis, de etiología viral, cuya causa haya sido confirmada por un método molecular en el Laboratorio Clínico, durante el período de enero del 2018 a junio del 2020.

Se trabajó con la población total definida por los criterios de inclusión y exclusión, no se realizó un muestreo.

4.3 Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión para la selección de la población fueron:

- Pacientes con 13 años o más, ambos géneros y sin restricción de etnia.
- Con una meningitis, encefalitis o meningoencefalitis documentada por criterio médico en el expediente institucional y con una prueba de detección viral molecular positiva, ya sea por la metodología de PCR-RT multiplex Fast Track Neuro-9. O por medio de la identificación molecular del panel para meningitis del Filmarray Biofire System.
- Se incluyeron solamente los pacientes que tuvieron presente en la base de datos del laboratorio, el análisis bioquímico y celular del LCR utilizado para el diagnóstico molecular.

4.4 Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con aislamientos moleculares de etiología viral no significativos clínicamente, que hayan sido descartados por el médico Infectólogo como meningitis o encefalitis.

4.5 Aspectos éticos

Por la naturaleza del estudio, al ser retrospectivo y observacional de casos ya descritos no fue necesario un consentimiento informado por parte de los pacientes incluidos. Sin

embargo, todo el protocolo de investigación fue autorizado por el Comité Ético Científico (CEC) del Hospital San Juan de Dios. El aval del CEC del Hospital se adjunta en el Anexo número 5.

4.6 Metodología desarrollada

Para la selección de los casos analizados, se procedió a revisar todos los resultados de las pruebas realizadas por el método Neuro-9 de la casa comercial Fast Track (41) y el método del Film Array (Biofire) para meningitis(42), durante enero del 2018 a junio del 2020, en el sistema informático del Laboratorio Clínico del HSJD.

El expediente institucional de todos los casos con algún aislamiento viral positivo se revisó en la Unidad de Registros Médicos del HSJD (Archivo). En el proceso se garantizó el principio de confidencialidad de los pacientes, bajo principios éticos y legales.

Del expediente se extrajeron los siguientes datos:

- la edad al momento del diagnóstico
- el género del paciente
- el servicio del Hospital en donde se valoró al momento de la consulta
- la presencia o ausencia de inmunosupresión, definiendo paciente inmunosupreso como aquel con cualquiera de los siguientes padecimientos: Trasplante de órgano sólido o médula ósea, paciente con tratamiento inmunosupresor, Nefropatas estadio IV-V, Hepatopatas Child Pugh B-C, Diabetes Mellitus tipo 2 no controlados con HbA1C mayor a 7%, neoplasia hematológica o de tumores sólidos, enfermedades reumatológicas, pacientes con VIH
- tipo de inmunosupresión según la clasificación del punto anterior
- los signos y síntomas de tipo neurológico que presentaron al momento de la consulta
- el virus que se detectó en la prueba molecular
- los datos de los hallazgos de laboratorio en el LCR específicamente: glucosa en LCR, proteínas en LCR, leucocitos en LCR, eritrocitos en LCR, diferencial del LCR y presencia/ausencia de globulinas en LCR.

La operacionalización de estas variables se encuentra en el Anexo 1. Todos los datos que se extrajeron del expediente a las hojas de recolección de datos se tabularon en un documento de Excel para su posterior procesamiento y análisis.

El análisis estadístico de la descripción de las variables clínicas y demográficas de la población fue analizado con estadística descriptiva, basada en medidas de tendencia central y de dispersión. Para las variables cualitativas que se describieron se utilizó distribuciones de frecuencia absolutas y relativas.

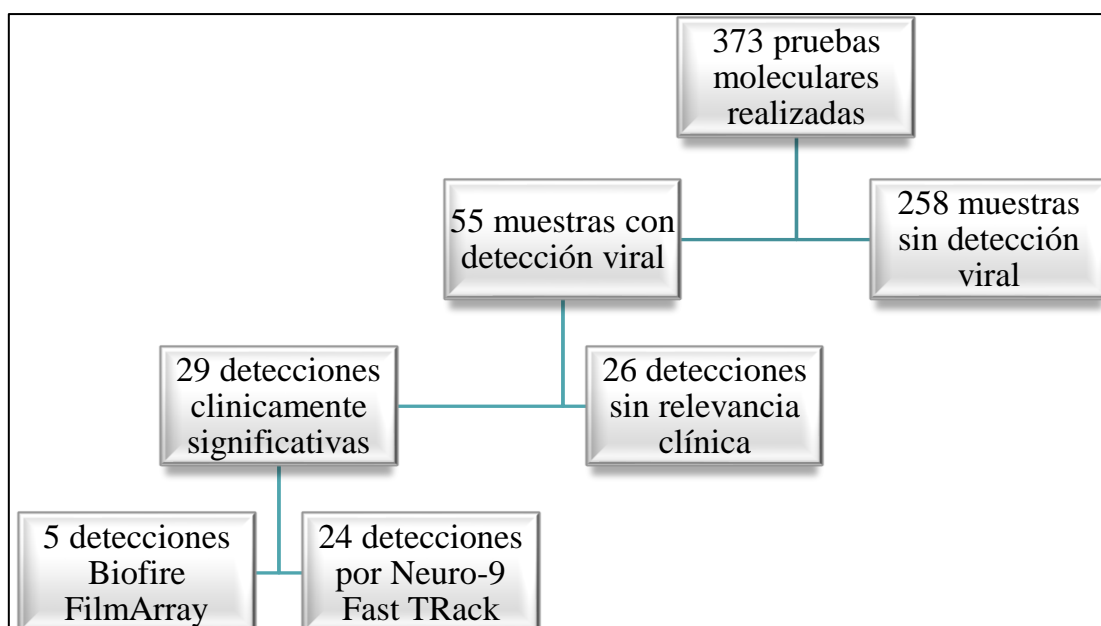
Para realizar la comparación de las variables del LCR entre la población inmunocompetente e inmunosupresa se utilizó la prueba Manne-Whitney U entre los dos grupos (95% CI). Todas las pruebas estadísticas se desarrollaron en el programa SPSS versión 20, y los gráficos fueron creados con el programa GraphPad Prism version 8.0.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

Capítulo 5. Resultados

Al clasificar las 373 pruebas de detección molecular en LCR que se realizaron desde enero del 2018 a junio del 2020 en el Laboratorio Clínico del HSJD, se ubicaron 55 muestras con alguna detección viral.

Como se detalló en la metodología, los datos e historia clínica de estos pacientes se revisaron en cada expediente. Según la información del expediente y la revisión posterior, solo 29 de estas 55 detecciones iniciales se consideraron clínicamente significativas, tal y como se esquematiza en la Figura 1. Las 26 pruebas positivas que no se clasificaron como clínicamente significativas, se omitieron por observaciones en el expediente en donde el médico tratante indicaba que el aislamiento no explicaba el cuadro, indicaciones que sugerían posible contaminación con sangre periférica o detecciones que se descartaban por presentarse como una coinfección con otro microorganismo patógeno como *Cryptosporidium* sp. o *Histoplasma* sp.

Figura 1. Esquema del tratamiento de los datos de todas las pruebas moleculares, para el diagnóstico de encefalitis y meningitis viral, realizadas de enero del 2018 a junio del 2020 en el HSJD.



5.1 Análisis demográfico y clínico de la población en estudio

El análisis de los datos demográficos de los pacientes en quien se realizaron las detecciones clínicamente significativas, presentó una mayoría de pacientes masculinos, un 75,9% y un 24,1% del sexo femenino. Respecto al origen del servicio del Hospital, las pruebas fueron solicitadas cuando un 58,6% de los pacientes se encontraban hospitalizados en algún salón, y un 41,4% se encontraban en el servicio de Emergencias.

Las detecciones se realizaron mayoritariamente con el panel molecular Neuro-9 de la casa comercial Fast-Track, un 82,8% de las muestras se analizaron con esta metodología, mientras que con la prueba de Film Array solamente un 17,2%, que corresponde a 5 del total. Las determinaciones por Film Array se realizaron mayoritariamente en pacientes críticos, en donde se requería una intervención inmediata, ya que este panel tiene un costo mucho más elevado que el Neuro-9 y el resultado se tiene en menos de una hora.

Al analizar el estado de competencia inmunológica de los pacientes que presentaron meningitis o encefalitis viral en el período de estudio, se encontraron más pacientes con algún tipo de inmunosupresión que pacientes inmunocompetentes, según los criterios de clasificación detallados en la metodología. Del total de pacientes, un 72,4% (n=21), eran pacientes con algún tipo de inmunosupresión. El 27,6% restante no presentaba ningún antecedente patológico en su expediente que lo clasificara como inmunosupreso.

Es importante indicar que la mitad del total de pacientes del estudio, eran pacientes positivos por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). 16 pacientes se anotaron con esta condición, lo que corresponde a un 55,2% del total. Los otros estados de inmunosupresión de los restantes 5 pacientes se pueden observar en la Tabla número 3. Se debe acotar que hubo un paciente VIH positivo con un linfoma de Hodgkin que se clasificó como neoplasia también, ya que ambas enfermedades se encontraban activas.

Únicamente se encontraron 4 causas de todas las condiciones que se anotaron en la metodología como estados de inmunosupresión. Es decir, no se encontró ningún paciente Nefrópata, paciente Hepatopa, paciente con Diabetes Mellitus tipo 2 no controlado y tampoco ningún paciente con enfermedad reumatológica.

Tabla 3. Variantes clínicas y demográficas de los pacientes con meningitis o encefalitis viral detectada por métodos moleculares en el HSJD, de enero del 2018 a junio del 2020.

	Porcentaje (%)	Número total (n)
Sexo		
Masculino	75,9	22
Femenino	24,1	7
Procedencia		
Hospitalizados	58,6	17
Emergencias	41,4	12
Edad		
	44,6	29
Estado competencia inmunológica		
Pacientes inmunocompetentes	27,6	8
Pacientes inmunosupresos	72,4	21
Pacientes VIH positivos	55,2	16
Pacientes con tratamiento inmunosupresor	10,3	3
Pacientes con neoplasia	6,9	2
Pacientes con trasplante de órgano	3,5	1
Pacientes nefropatía/hepatopatía	0	0
Pacientes con Diabetes Mellitus 2 no controlada	0	0
Pacientes con enfermedad reumatológica	0	0

Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

5.2 Signos y síntomas clínicos presentados por los pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes

A nivel general, el síntoma más frecuente para los pacientes con encefalitis y meningitis de causa viral fue la cefalea, se presentó en un 34,5% del total de pacientes. También la confusión y la alteración del estado mental se presentaron frecuentemente entre los pacientes, específicamente en un 31% de los 29 casos estudiados.

Sin embargo, si se analizan los signos y síntomas en la población de pacientes inmunosupresos y en la población de inmunocompetentes se anotan diferencias. Para los pacientes inmunocompetentes la somnolencia fue el signo más prevalente, se presentó en la mitad de los casos estudiados. En un 25% de los inmunocompetentes se presentó cefalea, alteración del estado mental, vómito, rigidez de cuello y signos neurológicos focales. En ninguno de estos pacientes se detectó fiebre ni alucinaciones, signos que si fueron observados en los inmunosupresos.

Al analizar la sintomatología y los signos de los pacientes inmunosupresos, se indica la cefalea y la fiebre como las alteraciones más frecuentes en los cuadros presentados por estos pacientes, ambas se detectaron en casi un 40% de todos los inmunosupresos. También se observó con más frecuencia la alteración del estado mental y confusión como signos neurológicos. Es importante destacar que, en estos pacientes con algún tipo de disfunción inmunológica, los signos clásicos de los cuadros de encefalitis y meningitis viral, como el vómito y la rigidez en cuello y espalda se presentaron en muy pocos casos. La rigidez de cuello y espalda no se presentó en ninguno de ellos, y el vómito solo en 2. Los datos generales y los asociados a cada grupo clasificado según su competencia inmunológica se pueden analizar en la tabla número 4.

Tabla 4. Signos y síntomas neurológicos presentados por los pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes diagnosticados con meningitis y encefalitis viral, en el HSJD durante enero del 2018 a junio del 2020.

	General		Inmunosupresos		Inmunocompetentes	
<i>Signos y síntomas neurológicos</i>	<i>Porcentaje (%)</i>	<i>Número total (n)</i>	<i>Porcentaje (%)</i>	<i>Número total (n)</i>	<i>Porcentaje (%)</i>	<i>Número total (n)</i>
Cefalea	34,5	10	38,1	8	25,0	2
Confusión	31,0	9	33,3	7	12,5	1
Alteración del estado mental	31,0	9	28,6	6	25,0	2
Fiebre	27,6	8	38,1	8	0	0
Debilidad muscular/paresia	17,2	5	14,3	3	25	2
Somnolencia	13,8	4	4,8	1	50,0	4
Vómito	10,3	3	9,5	2	25,0	2
Convulsiones	10,3	3	9,5	2	12,5	1
Alucinaciones	10,3	3	9,5	2	0	0
Rigidez en el cuello y la espalda	6,9	2	0	0	25,0	2
Cambios de comportamiento.	6,9	2	9,5	2	0	0
Fotofobia	3,4	1	4,8	1	0	0
Alteración del lenguaje	3,4	1	4,8	1	0	0

Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

5.3 Etiología viral de las meningitis y encefalitis.

De los 11 virus contenidos en los paneles de PCR, solo se detectaron 9 de ellos. No hubo ningún resultado positivo por Parvovirus B19 ni por Parechovirus.

En la tabla número 5, se muestra que, a nivel general, los virus con mayor cantidad de detecciones fueron EBV y VZV, ambos con un porcentaje total de 16,7% entre todos los

pacientes reportados. Después de estos dos virus se detectaron el CMV y el HSV2 en un 13,3% de todos los casos. Los virus herpes HHV6 y HHV7 junto con el ADV, estuvieron presentes en 3 pacientes cada uno (10%). Solo se detectaron dos casos con HSV1 y un único caso de EV.

Los virus detectados en la población de pacientes inmunocompetentes se redujeron a 5, en un 25 % de los casos de reportó VZV y HSV1. Los otros virus detectados fueron ADV, EV y HSV2.

En el caso de los pacientes inmunosupresos, los dos virus más importantes fueron el EBV con un 22,7% y el CMV con un 18,2%. También fueron importantes las detecciones de los virus de la familia Herpesviridae, se tuvo un 13,6% de casos asociados con VZV, HSV2, HHV6 y HHV7. No hubo ninguna detección realizada por EV o HSV1. Adicionar que se dio el caso de un paciente con VIH que presentó una coinfección con CMV y HHV6.

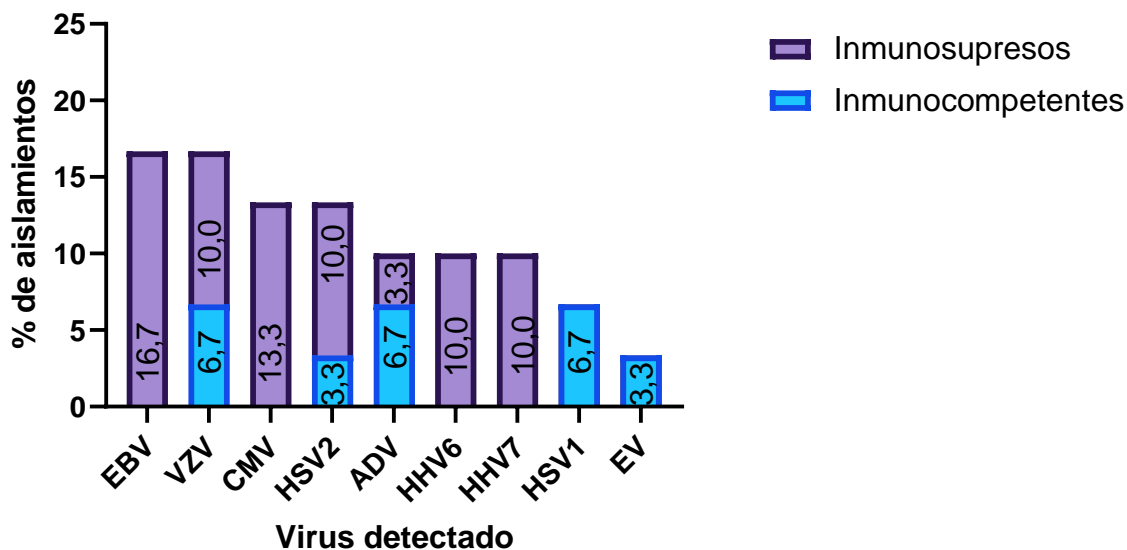
Tabla 5. Distribución de los virus detectados en el LCR de los pacientes diagnosticados con encefalitis o meningitis viral, en el HSJD durante enero del 2018 a junio del 2020.

Virus detectado	General		Inmunosupresos		Inmunocompetentes	
	Porcentaje (%)	Número total (n)	Porcentaje (%)	Número total (n)	Porcentaje (%)	Número total (n)
EBV	16,7	5	22,7	5	0	0
VZV	16,7	5	13,6	3	25,0	2
CMV	13,3	4	18,2	4	0	0
HSV2	13,3	4	13,6	3	12,5	1
ADV	10,0	3	4,5	1	25	2
HHV6	10,0	3	13,6	3	0	0
HHV7	10,0	3	13,6	3	0	0
HSV1	6,7	2	0	0	25,0	2
EV	3,3	1	0	0	12,5	1

Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

La distribución del porcentaje de pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes para cada uno de los virus se puede analizar en la Figura 2. En este se puede observar cómo los virus EBV, CMV, HHV6 y HHV7 solo fueron detectados en pacientes inmunosupresos. Y los EV y HSV1 solo tuvieron resultados positivos en pacientes inmunocompetentes. El virus VZV y ADV se detectaron en ambos tipos de pacientes.

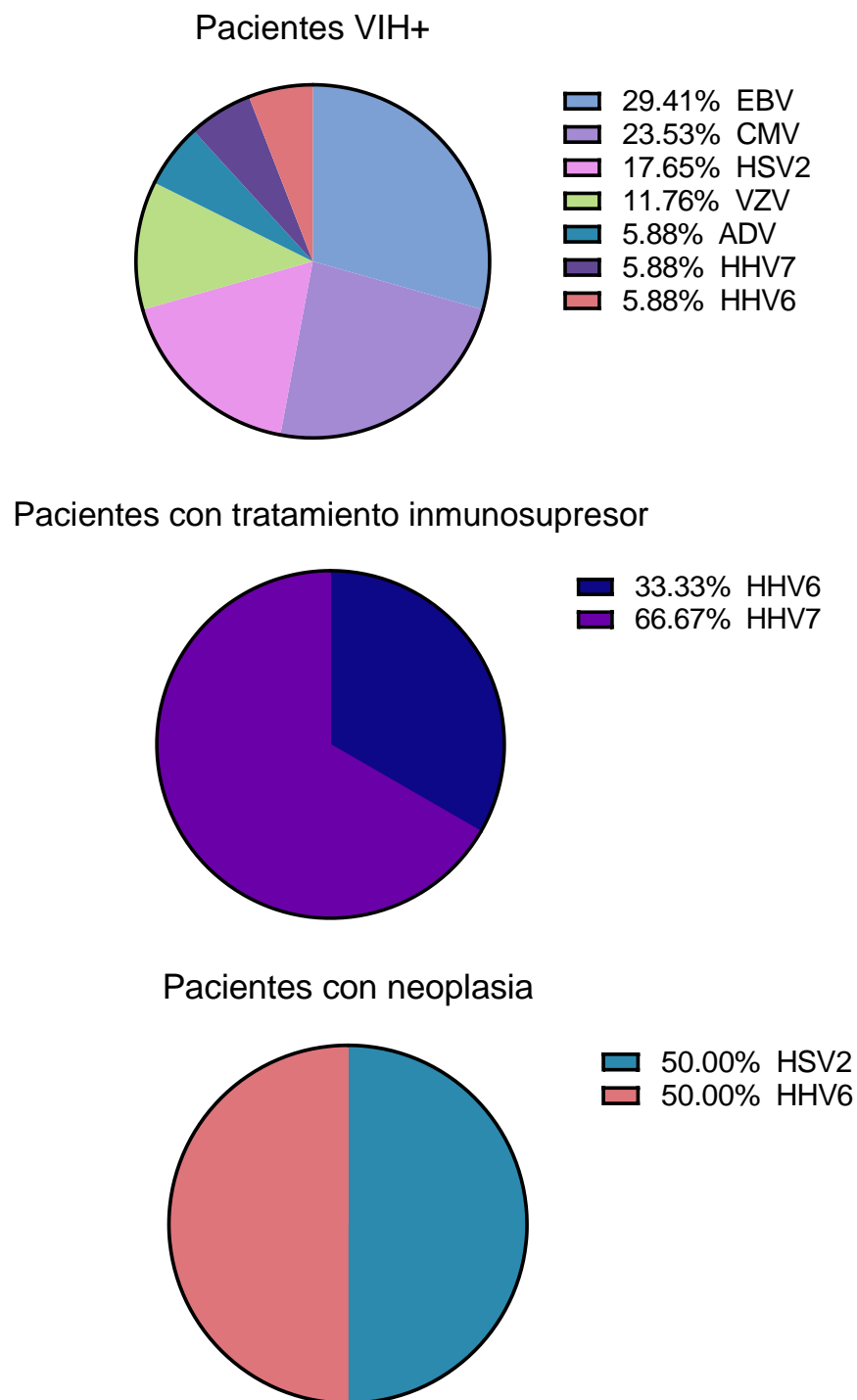
Figura 2. Distribución de las detecciones en pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos para cada uno de los virus detectados por métodos moleculares en el HSJD, durante el período de enero de 2018 a junio del 2020.



Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

Los pacientes con VIH representaron un poco más de la mitad de los casos estudiados totales. El organismo que se detectó con mayor frecuencia en estos pacientes fue el EBV, con un 29.4%, seguido del CMV con un 23.5% y el HSV2 con un 17,7%. Los otros virus que tuvieron importancia en estos pacientes se detallan en la Figura número 3. Las detecciones en pacientes con algún tratamiento inmunosupresor solo fueron 2, los virus HHV6 y HHV7. En los pacientes con cáncer se presentó el HSV2 y HHV6. El paciente con trasplante de órgano no se graficó por ser solo un caso, en éste se detectó VZV en el LCR.

Figura 3. Distribución de las detecciones realizadas en pacientes con encefalitis o meningitis viral, por métodos moleculares en el HSJD, durante el período de enero de 2018 a junio del 2020, de acuerdo con el tipo de inmunosupresión presentada.



Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

5.4 Hallazgos bioquímicos y celulares del análisis de LCR.

Del análisis bioquímico y celular del LCR que se recolectó de los pacientes estudiados, no fue posible incluir en el análisis la variable de presión de salida en cm de H₂O, debido a que en muy pocos de los expedientes revisados se anotaba esta medida.

El promedio y la desviación estándar de cada uno de los parámetros bioquímicos y celulares del LCR se pueden analizar en la Tabla 6. En ésta, se pueden observar las medidas de tendencia central generales para todos los pacientes del estudio, y la división de estas medidas para el grupo de inmunosupresos e inmunocompetentes.

En el caso de la detección de globulinas se detalla el resumen del resultado de muestras positivas y negativas para cada subpoblación de pacientes. También se puede observar que el diferencial leucocitario solo se realizó en las muestras de LCR que tenían un conteo de leucocitos mayor a 10/mm³, si las muestras no presentaban leucocitos o su conteo fue menor de 10 no se anotaron los resultados para esta variable.

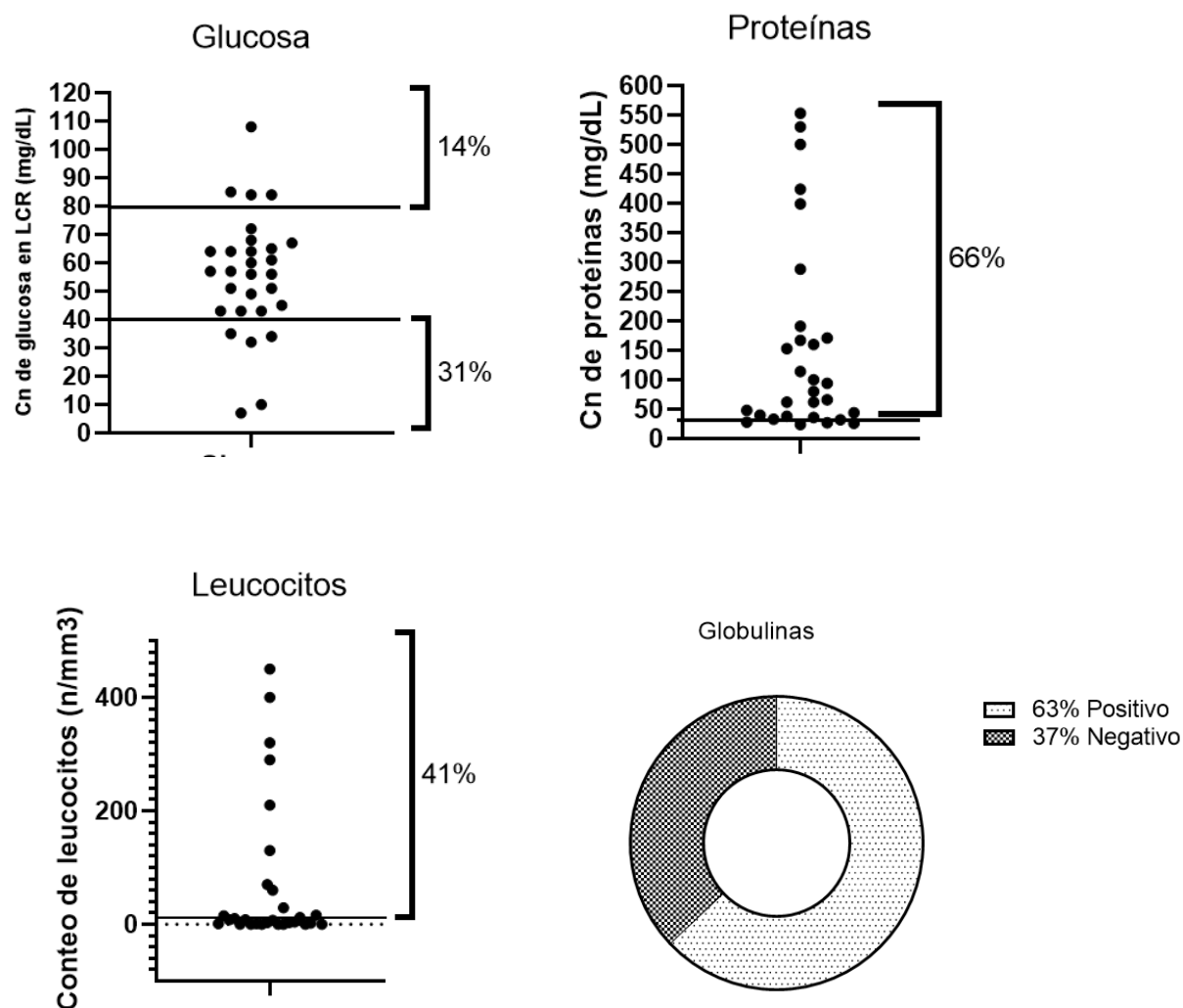
Tabla 6. Descripción estadística de las variables bioquímicas y celulares medidas en las muestras de LCR de los pacientes diagnosticados con encefalitis y meningitis viral, en el HSJD de enero del 2018 a junio del 2020.

	General	Inmunosupresos	Inmunocompetentes
	<i>Media</i>	<i>Media</i>	<i>Media</i>
Concentración de glucosa (mg/dL)	57,86 (n=29) Rango 7,0-171,0	51,1 (n=21) Rango 7,0-85,0	75,5 (n=8) Rango 35,0-171,0
Concentración de proteínas (mg/dL)	304,38 (n=29) Rango 8,0-5000,0	148,6 (n=21) Rango 26,0-553,0	713,3 (n=8) Rango 8,0-5000,0
Conteo del total de leucocitos mm3 (n)	70,4 (n=29) Rango 0-450,0	71,0 (n=21) Rango 0-450,0	68,8 (n=8) Rango 0-320,0
Porcentaje de neutrófilos (%)	19,8 (n=11) Rango 0-90	14,0 (n=8) Rango 0-79	35,3 (n=3) Rango 7-90
Porcentaje de linfocitos (%)	71,1 (n=11) Rango 10-100	73,5 (n=8) Rango 21-100	64,7 (n=3) Rango 10-93
Detección globulinas (positivo o negativo)	17 positivos 10 negativos (n=27)	14 positivos 5 negativos (n=19)	3 positivos 5 negativos (n=8)
Conteo del total de eritrocitos por mm3 (n)	854,4 (n=29) Rango 0-15850,0	399,6 (n=21) Rango 0-4500,0	1991,5 (n=8) Rango 0-15850,0

Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

Las variables celulares y bioquímicas fueron analizadas respecto a los valores normales estipulados por el Laboratorio Clínico. En la figura 4 se puede observar, que un 63,0% de los datos analizados para la concentración de proteínas estuvieron por encima de 45 mg/dL, un 13% tuvo una concentración de glucosa superior al rango establecido, 41,4% de todos los paciente presentó más de 10 leucocitos/mm3 y 62,9% de las pruebas de globulinas fueron positivas. Los parámetros que estuvieron fuera de los límites normales en más del 60% de los pacientes fueron la concentración de proteínas y las globulinas en LCR. En las otras variables el porcentaje de pacientes con resultados fuera del rango analítico patológico no superaron el 50%.

Figura 4. Porcentaje de pacientes con datos fuera de los rangos normales para las variables bioquímicas y celulares del análisis de líquido cefalorraquídeo, en las muestras de LCR de los pacientes diagnosticados con encefalitis y meningitis viral, en el HSJD de enero del 2018 a junio del 2020.



Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

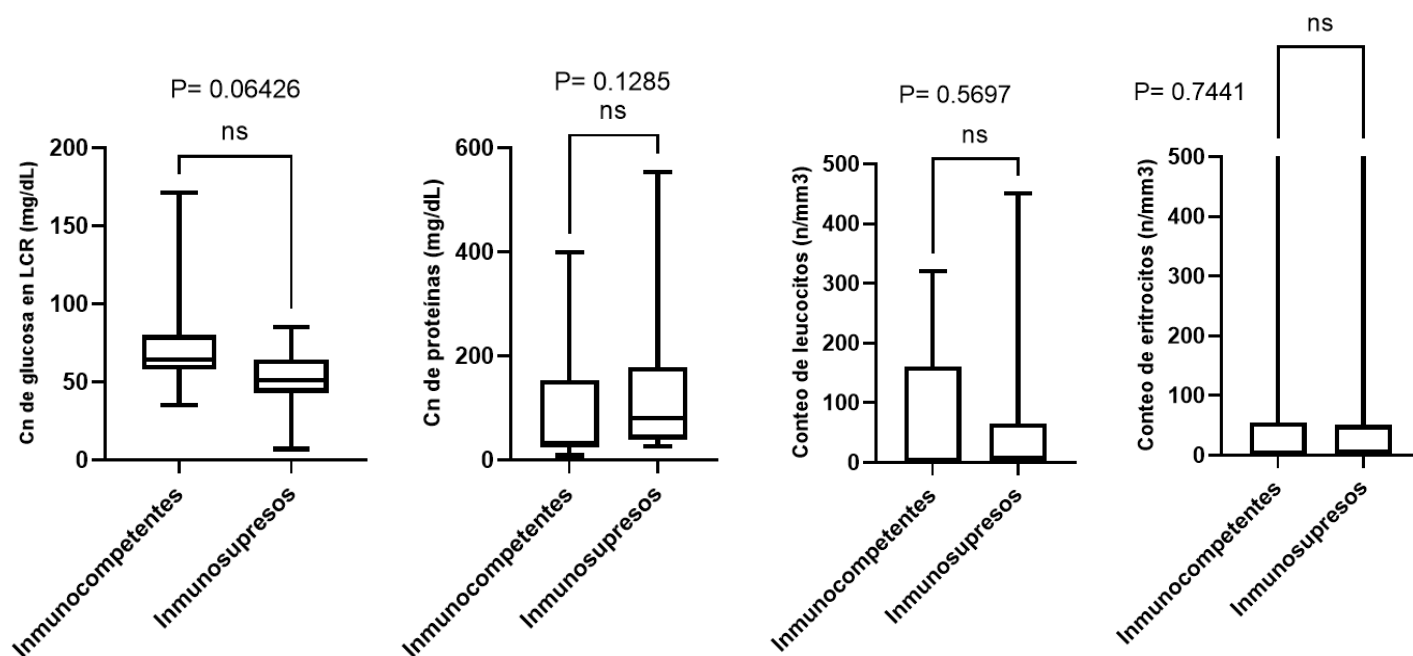
5.5 Comparación de los hallazgos bioquímicos y celulares entre el grupo de pacientes inmunosupresos y en el grupo de los inmunocompetentes.

La comparación estadística de los hallazgos en LCR de los pacientes inmunosupresos y los inmunocompetentes se realizó mediante la prueba no paramétrica Manne-Whitney U,

esto debido a que las muestras a comparar no seguían una distribución normal. Adicionalmente los parámetros estudiados contenían valores extremos, con lo que se procedió a realizar la comparación en base a sus medianas. Al comparar las variables de concentración de glucosa, concentración de proteínas, conteo de leucocitos, conteo de eritrocitos y la presencia de globulinas; los valores P en todos los casos fueron mayores a 0,05. Con lo que se afirma que para los datos de la presente investigación no existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados del LCR de los pacientes inmunosupresos y los inmunocompetentes, en ninguna de las variables estudiadas.

Los gráficos de cada comparación y su valor P se pueden observar en la Figura 5. En este gráfico se anota la comparación estadística por medio de la prueba Manne-Whitney y se puede visualizar la comparación de los datos de cada población.

Figura 5. Comparaciones entre los pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes, diagnosticados con encefalitis o meningitis viral, de los hallazgos bioquímicos y celulares observados en el LCR.



Fuente: Servicio de Archivo, Hospital San Juan de Dios, Caja Costarricense del Seguro Social

Capítulo 6. Discusión

6.1 El diagnóstico molecular es una herramienta vital en infecciones virales del SNC siempre y cuando se interprete con la clínica del paciente

La introducción del diagnóstico molecular para infecciones del Sistema Nervioso Central en el Hospital San Juan de Dios, ha sido una herramienta de mucho valor para el abordaje de pacientes con sospecha de algún tipo de neuroinfección. Especialmente en la detección de infecciones virales, ya que con los recursos que se tenían anteriormente en el Laboratorio Clínico, no era posible realizar ningún tipo de aislamiento ni cultivo celular. El diagnóstico viral de estos cuadros se realizaba a través de la clínica y algunos hallazgos en la bioquímica del líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, los cuadros virales son heterogéneos y muchas veces no presentan un comportamiento típico. Por este motivo, muchas infecciones en años anteriores quedaban sin diagnosticar adecuadamente. Los datos actuales demuestran que incluso hasta en los centros médicos con mayor disponibilidad de recursos, hasta dos tercios de los casos de las infecciones del SNC permanecen sin diagnosticar. También se ha demostrado, que cuando se tienen resultados satisfactorios en la evolución de los pacientes con estos cuadros clínicos, existe una asociación clara con la confirmación del diagnóstico molecular (43).

En los dos años y medio que se obtuvieron datos para este estudio, se realizaron 373 pruebas de paneles moleculares, teniendo 55 detecciones positivas por virus. De estas detecciones, fue posible realizar una correlación clínica adecuada con el virus en 29 de los 55 casos. El porcentaje de pacientes con una infección viral detectada y clínicamente validada fue de 7,8%, respecto al total de pacientes a quienes se les realizó el test molecular.

En estudios de infecciones virales del SNC en población adulta y condiciones metodológicas similares, se ha detectado un porcentaje de positividad clínicamente significativo del 6,3% (44), 7,15% (45) y 5% (46). En general, son valores que oscilan entre el 5% y 10%, los resultados dependen mucho de la epidemiología del lugar del estudio. Ya que, por ejemplo, en poblaciones asiáticas hay gran prevalencia de entidades virales que causan cuadros de encefalitis en la población. Patógenos que no circulan usualmente en Occidente.

Las causas de las detecciones positivas sin correlación clínica son varias, incluyen posibles contaminaciones en el laboratorio, presentación atípica de la infección viral, doble etiología entre pacientes con otras infecciones confirmadas, reactivaciones virales secundarias en respuesta al estrés de otra enfermedad en desarrollo y contaminación al momento de la punción lumbar con sangre periférica, en donde puede existir la presencia de material genético de algunos virus latentes (46,47).

6.2 Las metodologías de PCR utilizadas ofrecen distintas ventajas y desventajas según el tipo de paciente que se diagnostique

En el estudio se incluyeron dos metodologías moleculares diagnósticas: panel Neuro-9 de la casa comercial Fast Track y el método del Film Array Biofire para meningitis. Ambos tienen la ventaja de utilizar reacciones de PCR de alta sensibilidad y especificidad. El Film Array es el panel más utilizado para estos casos a nivel mundial, tiene la ventaja de ser un método rápido, con mínima intervención del usuario y de muy fácil interpretación. Por otro lado, el panel Neuro-9 es una alternativa muchísimo más barata si se compara con el Film Array, la diferencia en los costos para el Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios ronda los \$210 (\$250 dólares el Film Array, \$40 el Neuro-9). El tiempo de espera para obtener un resultado es de un par de horas más que para el Film Array y es necesaria la intervención de un usuario calificado en técnicas moleculares para el montaje e interpretación de esta prueba. Otra diferencia importante es que el Neuro-9 realiza la detección de 4 virus más que el Film Array lo que amplía las posibilidades de detección.

Por estos motivos es que se presentan 5 casos de detecciones con Biofire y las restantes 24 se hacen con Fast-Track, el mayor número de montajes en el Laboratorio Clínico se realizan con la metodología menos costosa. Las determinaciones por Film Array se realizaron mayoritariamente en pacientes críticos, en donde había alta sospecha de algún proceso inflamatorio a nivel del sistema nervioso central y se requería una intervención inmediata.

6.3 Los pacientes inmunosupresos y del sexo masculino tuvieron una mayor presencia en el estudio

Respecto a la información que se obtuvo de las características generales de la población estudiada, se observó una mayoría de detecciones en pacientes del sexo masculino, un 76% del total. En general, los reportes de estudios retrospectivos de infecciones virales del

SNC realizados en población adulta, muestran una mayoría de pacientes masculinos en todos los casos citados (44,45,48,49). Sin embargo, en estos estudios el porcentaje de pacientes masculinos no supera el 60% del total, el elevado número de pacientes masculinos en este estudio, está muy probablemente relacionado con el alto número de pacientes VIH positivos que se tuvo en la investigación, ya que en Costa Rica el 80% de las personas infectadas con VIH son hombres (50).

De todos los casos analizados en el período en estudio, un 72,4% de los pacientes presentaron una o más causas de inmunosupresión. El tipo de inmunosupresión más frecuente fue la infección por VIH, este grupo de pacientes se convirtió en el grupo más importante del total general también, con un 55,2%. En un estudio realizado en Colombia, utilizaron el panel Film Array como diagnóstico molecular para infecciones del SNC, en esta investigación también, los pacientes VIH positivos representaron el 50% del total (51).

Respecto a esta observación es importante destacar, que el tipo de atención que brinda el Hospital San Juan de Dios influyó mucho en el perfil de pacientes que reflejó el estudio. Población adulta, de un área metropolitana en donde se tratan pacientes con bastantes comorbilidades y enfermedades de alta complejidad. La atención del servicio de emergencias se polariza también hacía pacientes con afecciones graves y padecimientos agudos. Este perfil influyó en el resultado del estado de competencia inmunológica general.

Igualmente, está bien establecido en la literatura, que las infecciones del SNC se diagnostican con poca frecuencia en pacientes inmunocompetentes, pero ocurren en una proporción significativa de pacientes inmunodeprimidos y con cáncer (9,52). Las causas de incompetencia inmunológica más frecuentes en las infecciones virales del SNC se relacionan con las patologías que afectan la función de las células T, disfunciones generalmente causadas por la infección con VIH, tratamientos con anticuerpos monoclonales, así como las neutropenias generalmente causadas por inmunosupresión posterior a un trasplante (53). Como se evidencia en el estudio, precisamente las causas de inmunosupresión que presentaron los dos grupos con mayor porcentaje de pacientes son causas relacionadas con algún fallo en la función de los linfocitos T. Un 55,2% de los pacientes eran VIH positivos y un 10,3% eran pacientes con tratamiento inmunosupresor como glucocorticoides, medicamentos que, entre otros efectos, agotan las células T debido a la inhibición de la IL-2 e inducen la apoptosis de las células T.

6.4 Los signos y síntomas de los inmunosupresos e inmunocompetentes fueron diversos y difirieron entre los dos grupos

Al analizar las características clínicas, en general los signos y síntomas que aparecieron en la mayor cantidad de pacientes coinciden con los reportes descritos a nivel mundial. La triada de cefalea, fiebre y alteración del estado mental que se describe como la clínica más importante en este tipo de infecciones, también se presentó en el estudio. La fiebre, confusión y alteración del estado mental se manifestaron en más del 25% de los pacientes.

La cefalea fue el síntoma más frecuente descrito en la totalidad de los pacientes. Se presentó en un 34,5% de los casos. En los estudios descritos en la literatura, la cefalea siempre se presenta como el síntoma más importante en los casos de infecciones virales del SNC. El porcentaje varía bastante de estudio a estudio, pero se mantiene el primer lugar en frecuencia en todos ellos: 93,3% (34), 54% (45), 25,8% (44). A nivel general la presentación clínica de los cuadros de meningitis y encefalitis viral fue bastante diversa, ninguna característica clínica superó el 50% de los casos analizados. Esto podría estar relacionado con las distintas comorbilidades del grupo de pacientes del estudio y la situación de inmunosupresión que se presentó en el 72% de ellos.

Las presentaciones clínicas de los pacientes inmunosupresos y los inmunocompetentes tuvieron diferencias en cuanto a los signos y síntomas con mayor número de reportes. En los pacientes inmunocompetentes se presentaron en más de un 25% las características clásicas: vómito, rigidez nuchal, cefalea y alteración del estado mental. El síntoma más importante fue la somnolencia, que se manifestó en la mitad de los casos. Aunque en los cohortes de pacientes con infecciones virales descritos en la literatura la somnolencia no suele describirse como un síntoma de aparición frecuente, el número de pacientes en el grupo de inmunocompetentes no fue muy extenso, por lo que se muestra bastante heterogeneidad en la caracterización clínica.

Las presentaciones clínicas en pacientes inmunodeprimidos pueden conducir solo a síntomas muy sutiles. Son frecuentes las disfunciones cerebrales como confusión o alteración de la consciencia (10). Las presentaciones atípicas en estos pacientes pueden confundirse por los efectos inmunosupresores de las terapias, por la presencia de insuficiencia hepática y alteraciones metabólicas asociadas a la acumulación de fármacos. Por la condición de supresión la fiebre puede estar ausente (9). En la revisión de la historia clínica que se realizó de los pacientes inmunosuprimidos se anotaron un gran número de

signos y síntomas atípicos a estos cuadros, especialmente signos de deterioro cognitivo. Por ejemplo, en algunos pacientes se reportaron alucinaciones visuales y auditivas, alteración de la marcha y otros cuadros reportados con poca frecuencia en la literatura. La fiebre, cefalea y confusión estuvieron presentes en más del 30% de los pacientes, fueron los rasgos con mayor importancia.

6.5 Los virus que se detectaron en los pacientes estuvieron íntimamente relacionados con el estado de competencia inmunológica

Al igual que con la presentación clínica, hubo diferencias en la etiología viral de los aislamientos de los dos grupos estudiados.

En los pacientes inmunocompetentes se presentó un comportamiento esperable según la epidemiología descrita mundialmente. Cuando se analiza la etiología viral de las infecciones en población general, las causas son encabezadas por los enterovirus, seguido de los herpesvirus principalmente HSV-1 y VZV (7,11,27). El punto que llama la atención de esta investigación, es la cantidad tan baja de casos de Enterovirus. Los Enterovirus se encuentran como la causa principal de infecciones virales del SNC (7,27,36). En el estudio hubo solamente un caso por Enterovirus. La baja frecuencia podría ser explicada por varias razones: al ser cuadros de baja severidad y autolimitados muchos de ellos permanecen en los niveles de atención primaria de la Caja Costarricense del Seguro Social, por lo general las personas sanas consultan varios días después de iniciados los síntomas lo que en muchos casos impide la detección adecuada del virus en el LCR, no existen datos actuales de la prevalencia de este virus en Costa Rica, pero el sistema de agua potable y alcantarillado del país probablemente hace una contribución importante en la baja prevalencia de los reportes de estos virus.

Los pacientes inmunosuprimidos por tratamientos como corticoesteroides presentaron infecciones por HHV6 y HHV7. En los dos pacientes con neoplasias se detectaron HHV6 y HSV2. Teóricamente, la causa de la inmunosupresión en estos casos coincide con el hecho de que, en las detecciones de pacientes inmunosupresos se observa que los grupos de pacientes definidos predisponen a infecciones con ciertos patógenos basados en su patrón de inmunosupresión. La neutropenia (el déficit absoluto o función deteriorada), el trasplante hematopoyético o de órgano sólido, la quimioterapia intensiva predispone a neuroinfecciones por CMV, HSV, ADV, HHV6/7 y West Nile. En los trastornos relacionados

con linfocitos B como déficit de inmunoglobulinas, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple se presentan con mayor frecuencia Sarampión, West Nile y Enterovirus. Y las disfunciones de linfocitos T o de macrófagos predisponen a HSV, VZV, EBV, Virus JC y HHV6/7.

Los virus que se detectaron en los pacientes con neoplasia, tratamiento inmunosupresor y trasplante de órgano, son todos virus que pueden reactivarse en condiciones de inmunosupresión por diversas causas, principalmente porque los mecanismos del SI que normalmente suprimen o limitan la replicación viral pueden interrumpirse (54), la inmunosupresión conduce a la pérdida de las células de memoria residentes y con ello la reactivación de la replicación viral (55).

En los estados de latencia, después de la infección inicial en las células epiteliales, estos virus se convierten en no-líticos dentro de las neuronas del sistema nervioso periférico, y el ácido nucleico viral es mantenido en un estado episomal de heterocromatina con una transcripción insignificante. Una pequeña cantidad de transcripciones virales se sintetizan durante la latencia y se denominan transcripciones asociadas a la latencia. Estas especies de ARN no codifican por proteínas funcionales, pero se cree que previenen la apoptosis neuronal e interrumpen la señalización tanto innata como adaptativa a través de mecanismos que incluyen la inhibición de la actividad de caspasa y la apoptosis mediada por granzima B (55).

6.6 Los virus de la familia Herpesviridae fueron la detección principal en los pacientes con VIH

Las causas de infección en pacientes con VIH que se presentaron fueron diversas, pero la mitad de los casos se distribuyó entre CMV y EBV. Similarmente en estudios realizados con pacientes VIH+ en Uganda se detectaron en orden de frecuencia: EBV, CMV y VZV (56), y en pacientes diagnosticados en China: CMV, VZV y virus JC (57). Los paneles que se utilizaron en el estudio no poseen los primers para la detección de virus JC, que es un patógeno importante en los pacientes VIH+.

Todos los virus detectados en estos pacientes pertenecen a la familia Herpesviridae, a excepción del Adenovirus. Esta relación del VIH con la familia Herpesviridae (HHV), se debe a que tanto el VIH como las infecciones por HHV persisten durante toda la vida, y casi todas las personas infectadas por el VIH también están infectadas con ≥ 1 HHV (58). Desde la

primera descripción del VIH, las coinfecciones con los HHV han sido parte de la presentación clínica (y responsable de varias condiciones que definen el SIDA) y se encuentran entre las infecciones oportunistas más comunes observadas en personas con VIH (58).

Las infecciones neurológicas en personas VIH+ por CMV y EBV ocurren casi exclusivamente en pacientes con un conteo celular de CD4+ <50 células/mm³ (59). La activación inmune es un sello distintivo de la infección por VIH-1 y juega un papel importante en la infección por CMV y EBV, la depleción de células T CD4+ y la disfunción inmunológica del organismo con esta depleción hace que haya una activación inmune de estos virus que se encuentran latentes en casi todos los pacientes (58). En las infecciones por CMV, existe una relación entre los dos virus y los eventos patológicos que tienen lugar después de la severa inmunosupresión causada por el VIH. Estos dos virus actúan de forma sinérgica, por ejemplo, el CMV estimula la expresión y liberación de una serie de citocinas que permiten la activación del ADN del VIH y activa adicionalmente el ADN proviral del VIH, lo que se traduce en una carga viral de VIH más alta y una progresión rápida al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (58). La hiperactivación que realiza el VIH en las células B, conduce a una sobreproducción de citoquinas estimuladoras, que además de activar las células B, también son potentes supresoras de células T y macrófagos. Niveles relativamente altos de IL-10 afectan la generación de células T efectivas que controlan el EBV y esto permite el crecimiento de estas células infectadas por el virus, especialmente en pacientes con VIH que ya tienen la inmunidad de células T deteriorada (60).

6.7 La detección de casos de Adenovirus fue un hallazgo importante del estudio

Se tuvieron 3 casos de infecciones por Adenovirus. Con este virus hay una observación importante, ya que la mayoría de estudios descritos en la literatura utilizan la metodología de Film Array para el diagnóstico viral, este panel no detecta Adenovirus. ADV ha sido pobremente documentado como agente de meningitis y encefalitis y la mayoría de los informes se limitan a informe de casos. En el estudio descrito por Ben Abid *et al.*, se reporta un 4% de prevalencia de Adenovirus entre todos los LCR analizados. En otro estudio del 2019 en Brasil se documentó un 1,8% de aislamientos por ADV durante un período de 3 años (61).

La infección del SNC por ADV es más frecuente en huéspedes inmunodeprimidos, un estudio mostró que la encefalitis por ADV diagnosticada por PCR en casos de enfermedades neurológicas es un 5,5% más frecuente entre los huéspedes inmunosuprimidos y un 3% más en los huéspedes que se han sometido a un trasplante de células madre (61). En el estudio, se presentó un paciente con infección por VIH y dos pacientes inmunocompetentes, pero de edad avanzada. En este caso, es necesario más estudios donde se detecte este virus para conocer la prevalencia real y el comportamiento de éste, especialmente es pacientes inmunocompetentes.

Respecto a los pacientes de edad avanzada, la infección por Adenovirus se podría analizar desde el aspecto de la inmunosenescencia. Por un lado, los cambios conforme avanza la edad, parecen aumentar la susceptibilidad a ciertas enfermedades o síndromes. Mientras por el otro, se propone que son resultado de la evolución y que son el reflejo de un sistema inmunológico que cumplió su rol durante toda una vida (los cambios en lugar de deterioro e hipofuncionamiento se deberían de ver como adaptaciones progresivas) (62).

Las razones por las cuales el sistema inmunológico parece sufrir estas adaptaciones son:

- Eficiencia energética: Conforme avanza la edad los mecanismos de producción energética son menos eficientes, en parte por la disfunción mitocondrial, de modo que el sistema inmunológico tiene menor disponibilidad de recursos. Esto parece justificar que seleccione mantener ciertos mecanismos a expensas de otros. Por ejemplo, mantener un fuerte repertorio de células T CD8+ oligoclonales contra virus como CMV en lugar de mantener poblaciones de linfocitos T vírgenes que están esperando su primer contacto con un nuevo antígeno (62,63).
- Disminución del daño colateral: Las secuelas de la respuesta inflamatoria siempre son importantes. De modo que la evidencia apunta que el sistema inmunológico realiza un ajuste progresivo de la intensidad de la inflamación con la finalidad de evitar el daño tisular excesivo (62,63).

6.8 Los casos que finalizaron con la muerte del paciente fueron causa del virus Varicela Zoster.

En el estudio hubo dos casos cuya causa de defunción fue la meningitis causada por VZV. Un caso se presentó en un paciente con VIH, y el otro paciente era inmunocompetente. En

una investigación similar con 97 detecciones, se reportaron 3 muertes en total, todas ellas ocasionadas por VZV (44). Varios estudios han asociado las neuroinfecciones por VZV con un porcentaje considerable de secuelas neurológicas y muertes asociadas (30,64,65). La mortalidad de VZV podría explicarse porque se ha comprobado que el virus, produce un daño neuronal severo y astrogliosis en pacientes con cuadros de encefalitis. La tasa de mortalidad aumenta conforme avanza la edad y con el retraso en el inicio de terapia con aciclovir (64).

6.9 La concentración elevada de proteínas y la presencia de globulinas estuvieron presentes en la mayoría de los pacientes.

Al analizar los parámetros bioquímicos y celulares del líquido cefalorraquídeo de acuerdo con los valores normales considerados por el Laboratorio Clínico, se pudo observar que la mayoría de los pacientes (un 65,5%) tuvo valores superiores al rango normal en la concentración de proteínas y en un 63,0% se detectó la presencia de globulinas. Los otros parámetros estudiados mantuvieron valores normales en más del 50% de los pacientes. El patrón típico de LCR consistente con infecciones virales es: la proteína total levemente elevada o normal, glucosa normal y pleocitosis linfocítica moderada (4). Sin embargo, este patrón varía de acuerdo con el virus y al individuo. Únicamente 9 de todos los pacientes presentaron pleocitosis linfocítica.

Las anteriores observaciones son muy importantes y se deberían de tomar en cuenta para casos sospechosos futuros, ya que es una práctica común de algunos profesionales de la salud, es frecuente excluir una posible infección viral del sistema nervioso central basándose en el patrón esperado del análisis bioquímico y celular del líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, los datos de este estudio demuestran que no existe un patrón particular y la posibilidad de infección viral debería ser considerada de acuerdo con cada paciente y especialmente tomando en cuenta las enfermedades de fondo.

Varios estudios analizados han llegado a la misma conclusión, un estudio utilizó muestras de LCR de 1025 pacientes pediátricos previamente sanos y/o inmunocomprometidos y en otro estudio retrospectivo de 11 años, analizaron 2604 pacientes adultos con cuadros virales del SNC. Analizaron si la presencia de ciertos parámetros clínicos, incluida la pleocitosis en LCR, los niveles anormales de glucosa y proteína en el LCR y leucocitosis en sangre estaban asociados o proporcionando precisión diagnóstica con resultados

positivos de detección molecular de patógenos. De acuerdo con los resultados, de los pacientes analizados, todos los parámetros de biomarcadores clínicos mostraron valor predictivo positivo pobre y pobre sensibilidad en la capacidad de predecir los resultados positivos. Esto quiere decir, que si se hubiesen restringido esos análisis solamente a decisiones basadas en pleocitosis u otros hallazgos anormales de LCR, se habrían perdido un número significativo de oportunidades de diagnóstico (22,66).

6.10 No hubo diferencia estadísticamente significativa en los hallazgos de LCR de pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes.

Las pruebas estadísticas que se realizaron al comparar los dos grupos de estudio demostraron que para los datos obtenidos no existe diferencia significativa entre los parámetros de: concentración de proteínas, concentración de glucosa, celularidad, la presencia de globulinas y el conteo de eritrocitos en líquido cefalorraquídeo. De acuerdo con el estado de competencia inmunológica no hubo ninguna diferencia en los biomarcadores del LCR.

No existe un gran número de investigaciones que compare la bioquímica y celularidad en pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes. Los tres estudios que comparaban biomarcadores para pacientes sanos y los pacientes con co-morbilidades que los condicionaran a inmunosupresión llegaron a la misma conclusión. Se encontró que la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo fueron comparables entre las dos poblaciones, es decir, se concluyó que el estado inmune no influyó en la capacidad de los biomarcadores de LCR para predecir los resultados de las pruebas positivas en los pacientes (22,23,66). Como se puede analizar, los hallazgos del LCR, son diversos y ambiguos en muchos casos. No hay un patrón que ligue los biomarcadores en la población inmunosupresora y tampoco en la inmunocompetente. Aunado a esto, se debe aclarar que muchos de los parámetros celulares están condicionados a la subjetividad del operador que observa la muestra, lo que confiere menos exactitud en estas mediciones y, por lo tanto, menos capacidad comparativa entre resultados.

Capítulo 7. Conclusiones

El estudio se convierte en el primer reporte que analiza la clínica y epidemiología de infecciones del sistema nervioso central causadas por virus, a nivel de Costa Rica.

Las detecciones virales por métodos moleculares en LCR, deben ser valoradas de acuerdo con la clínica y antecedentes del paciente, para descartar posibles hallazgos clínicamente no significativos.

Una limitación de las dos metodologías utilizadas y por lo tanto también del estudio, es que la detección se restringe a los virus que proporcionan los kits disponibles y que no necesariamente se ajustan a la epidemiología de Costa Rica. Además de esto, ninguno de los dos paneles utiliza cuantificación de la carga viral del organismo detectado, información que es muy útil en casos de co-infecciones o posibles contaminaciones en el laboratorio.

Las detecciones virales fueron más frecuentes en pacientes del sexo masculino y la mayoría de los pacientes (72,4%) presentaba alguna condición que suprimía su Sistema Inmunológico.

Todas las causas de inmunosupresión de los pacientes con detecciones virales clínicamente significativas estuvieron relacionadas con algún tipo de deficiencia o depleción de los linfocitos T.

Los pacientes VIH positivos fueron la población mayoritaria del estudio, con un 55,2% del total general.

La cefalea fue el síntoma más frecuente entre todos los casos del estudio, seguido de la alteración del estado mental y la fiebre.

Los signos y síntomas de tipo neurológico con mayor frecuencia de presentación, difirieron entre la población de inmunosupresos e inmunocompetentes. En los pacientes sin inmunosupresión además de la cefalea, fue más prevalente la somnolencia y las características típicas de estos cuadros como vómito y rigidez de cuello y espalda. En los inmunosupresos se presentó la alteración del estado mental, la fiebre y la confusión. Sin embargo, se anota como una limitación del estudio la cantidad de pacientes inmunocompetentes en comparación con los inmunosupresos, al ser un número limitado de inmunocompetentes, las características clínicas variaron más y la comparación no mostró una equidad adecuada.

En los pacientes con algún tipo de inmunosupresión se presentaron signos y síntomas atípicos para los cuadros de meningitis y encefalitis viral. Especialmente fueron frecuentes aquellos en los que se detectó algún signo de deterioro cognitivo.

La etiología viral de los cuadros estuvo íntimamente relacionada con el estado de competencia inmunológica. En el caso de los inmunocompetentes los virus con mayor número de detecciones fueron VZV, HSV-1 y ADV.

Los virus con mayor importancia en los inmunosupresos fueron virus que se mantienen en latencia en la mayoría de la población adulta. Estos virus fueron el EBV y el CMV, agentes que en condiciones de inmunosupresión o disminución de la vigilancia del SI pueden causar infecciones en el SNC por reactivaciones.

Todos los pacientes con tratamiento inmunosupresor presentaron infección por HHV-6 o HHV-7.

Los virus de la familia Herpesviridae fueron los aislamientos más importantes en los pacientes con VIH.

A diferencia de los reportes a nivel mundial, los casos por Enterovirus no tuvieron gran importancia en este estudio, únicamente se reportó una detección.

En los dos casos en donde los pacientes fallecieron a causa de la infección del SNC, el organismo diagnosticado fue el virus Varicela Zoster.

En más del 50% de las infecciones virales analizadas, la concentración de proteínas en el LCR estaba por encima del rango de referencia normal. También en más de la mitad, las globulinas en el LCR tuvieron un resultado positivo.

En un 41% de los pacientes el conteo de leucocitos fue mayor de 10 células/mm³, en todos estos pacientes el porcentaje de linfocitos superó el de los neutrófilos.

La comparación estadística de los hallazgos bioquímicos y celulares del LCR entre pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes no arrojó ninguna diferencia significativa. Lo que nos indica que, a pesar de las condiciones patológicas pre-existentes, el comportamiento de estos hallazgos no presenta diferencias, por lo que ninguna sospecha de infección viral del SNC debería ser descartada solamente por los resultados del análisis celular y bioquímico del LCR.

Recomendaciones

A nivel general, cuando se sospecha de una neuro-infección viral, se recomienda el uso de la metodología de PCR tiempo real de tipo multiplex (Neuro-9 y similares) sobre las detecciones de Film Array. Esto debido a la mayor diversidad en los agentes virales detectables, el costo menos elevado y la posibilidad de observar las curvas de amplificación, que en muchos casos son importantes para tomar decisiones clínicas.

Según los recursos del Laboratorio de Biología Molecular del HSJD, se recomienda el montaje de PCR por virus JC en todas las muestras de pacientes VIH positivos que se presenten con sospecha de meningitis o encefalitis.

En los pacientes con algún tipo de inmunosupresión, especialmente por deficiencias o disfunciones en los linfocitos T, se debe hacer una valoración exhaustiva de cualquier signo o síntoma atípico de infección del SNC. Con especial importancia en signos de deterioro cognitivo como alucinaciones, alteración del habla, alteración de la marcha, delirios o síndromes confusionales agudos.

Como recomendación general, a modo de aumentar el conocimiento acerca de las infecciones virales del SNC en Costa Rica, el estudio se podría ampliar con los datos del Hospital Calderón Guardia y Hospital México. Esto con el fin de proveer un mayor conocimiento acerca de estos cuadros de los que no se tiene muchos datos epidemiológicos ni información clínica para la población costarricense. Lo que probablemente esté causando un subregistro importante de los casos.

Bibliografía

1. Domínguez-Gil M, Artero A, Oteo JA, Eiros JM. Virology: syndromic diagnosis of meningitis and encephalitis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2020;38(Supl 1):19–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.004>
2. Pierdant M, Gordillo-moscoso A. infecciosa en la sala de urgencias Determinantes clínico-diagnósticos en adultos con sospecha de meningitis infecciosa en la sala de urgencias. 2018;(August).
3. Zimmer A, Burke V, Bloch KC. Central Nervous System Infections2. *Microbiol Spectr*. 2016;(May 2020):262–82.
4. Cho TA, Mckendall RR. Clinical approach to the syndromes of viral encephalitis, myelitis, and meningitis [Internet]. 1st ed. Vol. 123, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2014. 89–121 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-53488-0.00004-3>
5. Piquet AL, Lyons JL. Infectious Meningitis and Encephalitis. *Semin Neurol*. 2016;36(4):367–72.
6. Giovane RA, Lavender PD. Central Nervous System Infections. *Prim Care - Clin Off Pract* [Internet]. 2018;45(3):505–18. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pop.2018.05.007>
7. Boucher A, Herrmann JL, Morand P, Buzelé R, Crabol Y, Stahl JP, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016. *Med Mal Infect* [Internet]. 2017;47(3):221–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2017.02.003>
8. Swanson PA, McGavern DB. Viral diseases of the central nervous system. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2015;11:44–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.12.009>
9. Sonnevile R, Magalhaes E, Meyfroidt G. Central nervous system infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Crit Care*. 2017;23(2):128–33.
10. Castro I, Montero M. Practical approach by main clinical syndromes Central nervous system infections in immunocompromised patients. 2018;31:56–61.
11. Miller S, Mateen FJ, Aksamit AJ. Herpes simplex virus 2 meningitis: A retrospective cohort study. *J Neurovirol*. 2013;19(2):166–71.
12. Bookstaver PB, Mohorn PL, Shah A, Tesh LD, Quidley AM, Kothari R, et al. Management of Viral Central Nervous System Infections: A Primer for Clinicians. *J Cent Nerv Syst Dis*. 2017;9:117957351770334.
13. Wilson MR. Meningitis, Viral. *Encycl Neurol Sci*. 2014;(January):1077–81.
14. Korn T, Kallies A. T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2017;17(3):179–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.144>
15. Klein RS, Garber C, Howard N. Infectious immunity in the central nervous system and brain function. *Nat Immunol*. 2017;18(2):132–41.
16. Russo M V., McGavern DB. Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury. *Trends Immunol* [Internet]. 2015;36(10):637–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.08.002>
17. Louveau A, Harris TH, Kipnis J. Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends Immunol* [Internet]. 2015;36(10):569–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.08.006>
18. Quesada Yamasaki D, Arce Soto E, Ramírez Chan K, Fornaguera Trías J, Mora Gallegos A. El papel de la microglía en la señalización neuroinflamatoria y la respuesta neuroinmune. *Rev eNeurobiología*, vol 7(16), pp1-13. 2016;(October).
19. Engelhardt B, Carare RO, Bechmann I, Flügel A, Laman JD, Weller RO. Vascular,

- glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2016;132(3):317–38.
20. Das MK, Chakraborty T. Molecular Diagnosis of CNS Viral Infections [Internet]. *The Microbiology of Central Nervous System Infections*. Elsevier Inc.; 2018. 45–59 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813806-9.00003-2>
21. Lipkin WI, Hornig M. Diagnostics and discovery in viral central nervous system infections. *Brain Pathol.* 2015;25(5):600–4.
22. Kleines M, Scheithauer S, Schiefer J, Häusler M. Clinical application of viral cerebrospinal fluid PCR testing for diagnosis of central nervous system disorders: A retrospective 11-year experience. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2014;80(3):207–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.07.010>
23. Davies NWS, Brown LJ, Gonde J, Irish D, Robinson RO, Swan A V., et al. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005;76(1):82–7.
24. McGill F, Griffiths MJ, Solomon T. Viral meningitis: Current issues in diagnosis and treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2017;30(2):248–56.
25. Radmard S, Reid S, Ciryam P, Boubour A, Ho N, Zucker J, et al. Clinical Utilization of the FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) Assay. *Front Neurol.* 2019;10(March):1–8.
26. Wright WF, Pinto CN, Palisoc K, Baghli S. Viral (aseptic) meningitis: A review. *J Neurol Sci* [Internet]. 2019;398:176–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2019.01.050>
27. Florén-Zabala L, Chamizo-López FJ, Eisman-Maraver A, Pérez-González C, De Ory-Marchón F, Trallero-Maso G, et al. Meningitis aséptica en la población adulta. Etiología y utilidad de las técnicas moleculares en el manejo clínico del paciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(7):361–6.
28. Jeffery KJM, Read SJ, Peto TEA, Mayon-White RT, Bangham CRM. Diagnosis of viral infections of the central nervous system: Clinical interpretation of PCR results. *Lancet.* 1997;349(9048):313–7.
29. Weinberg A, Bloch KC, Li S, Tang Y, Palmer M, Tyler KL. Dual Infections of the Central Nervous System with Epstein-Barr Virus. *J Infect Dis.* 2005;191(2):234–7.
30. Ihekweaba UK, Kudesia G, McKendrick MW. Clinical Features of Viral Meningitis in Adults: Significant Differences in Cerebrospinal Fluid Findings among Herpes Simplex Virus, Varicella Zoster Virus, and Enterovirus Infections. *Clin Infect Dis.* 2008;47(6):783–9.
31. Aguilera EA, Salazar L, Soriano A, Ulloa-gutierrez R, Camacho K, Hernández M, et al. Meningitis with a Negative Cerebrospinal Fluid Gram Stain in Children : A Tale of Two Cities. 2016;(October 2013).
32. Dittrich T, Marsch S, Egli A, Rüegg S, Marchis GM De, Tschudin-sutter S, et al. Predictors of infectious meningitis or encephalitis : the yield of cerebrospinal fluid in a cross-sectional study. 2020;1–12.
33. Portillo C, Báez E, Agüero M, Coronel W, Samudio G. Artículo Original / Original Article Enterovirus asociados a Afecciones del Sistema Nervioso Central confirmados por biología molecular Enteroviruses associated with Central Nervous System Infections confirmed by molecular biology. 2019;17(November 2007):25–31.
34. Jarrin I, Sellier P, Lopes A, Morgand M, Makovec T, Delcey V, et al. Etiologies and management of aseptic meningitis in patients admitted to an Internal Medicine Department. *Med (United States).* 2016;95(2):1–9.
35. González Suarez Y, Sánchez Frenes P, Mediaceja Vicente O, Yadira González Suarez L. Variables citoquímicas del líquido cefalorraquídeo en infecciones del

- sistema nervioso central. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* [Internet]. 2013;60(4):252–8. Available from: www.medigraphic.com/patologiaclinicawww.medigraphic.org.mx
36. Facure S. Características clínicas y biológicas de la meningitis enteroviral. *Clinical and biological characteristics of Enteroviral Meningitis*. 2020;132–7.
 37. Conca N. Respuesta a la Carta al Editor: Diagnóstico etiológico en meningitis y encefalitis por técnicas de biología molecular. *Rev Chil Pediatr*. 2016;87(6):512–3.
 38. Ministerio de Salud de Costa Rica. Unidad de Seguimiento de Indicadores de Salud. *Bol Estadístico Mortal por Enfermedades Oblig en Costa Rica del año 2015*. 2015;
 39. Sarkis J, Castillo C, Ortíz O. Estudio de 116 casos de Meningitis en el Hospital San Juan de Dios, durante los años 1964 a 1969. *Rev Med Costa Rica*. 1969;(420):307–17.
 40. Fernández S. Infección por Enterovirus en Sistema Nervioso Central en los pacientes egresados en el Hospital Nacional de Niños “Dr. Carlos Sáenz Herrera”: Epidemiología en el período comprendido entre marzo 2013 y mayo 2015. In *Situ*. Universidad de Costa Rica; 2010.
 41. Siemens Healthcare GmbH. *Manual Neuro-9 Fast Track Diagnostic*. 11414177_es Rev. A, 2019-01. 2019. p. 205–20.
 42. Diagnostics B. *FilmArray® Meningitis/Encephalitis (ME) Panel Instruction Booklet*. 2015.
 43. Houlihan CF, Bharucha T, Breuer J. Advances in molecular diagnostic testing for central nervous system infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(3):244–50.
 44. Aldriweesh MA, Shafaay EA, Alwatban SM, Alkethami OM, Aljuraifi FN, Bosaeed M, et al. Viruses Causing Aseptic Meningitis: A Tertiary Medical Center Experience With a Multiplex PCR Assay. *Front Neurol*. 2020;11(December):1–9.
 45. Ben Abid F, Abukhattab M, Ghazouani H, Khalil O, Gohar A, Al Soub H, et al. Epidemiology and clinical outcomes of viral central nervous system infections. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2018;73:85–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.06.008>
 46. Bhaskaran A, Racsa L, Gander R, Southern P, Cavuoti D, Alatoom A. Interpretation of positive molecular tests of common viruses in the cerebrospinal fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2013;77(3):236–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.017>
 47. Mamoojee Y, Chadwick D. How appropriate are cerebrospinal fluid polymerase chain reaction requests for suspected central nervous system infections? *Clin Med J R Coll Physicians London*. 2011;11(6):554–7.
 48. Nowak DA, Boehmer R, Fuchs HH. A retrospective clinical, laboratory and outcome analysis in 43 cases of acute aseptic meningitis. *Eur J Neurol*. 2003;10(3):271–80.
 49. Khatib U, van de Beek D, Lees JA, Brouwer MC. Adults with suspected central nervous system infection: A prospective study of diagnostic accuracy. *J Infect* [Internet]. 2017;74(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2016.09.007>
 50. Ministerio de Salud de Costa Rica. Plan Estratégico Nacional (PEN) en VIH y SIDA, 2016-2021 [Internet]. Ministerio de Salud Pública Costa Rica. 2016. 1–88 p. Available from: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/963-plan-estrategico-nacional-pen-vih-sida/file>
 51. Díaz KMO, Piedrahíta JAA, Suárez Brochero OF, Granada DO, Barón LM, Bonilla IC, et al. Impact of the Film Array Meningitis/Encephalitis panel in adults with meningitis and encephalitis in Colombia. *Epidemiol Infect*. 2020;148:e173.
 52. Pruitt AA. Central Nervous System Infections Complicating Immunosuppression and

- Transplantation. *Contin Lifelong Learn Neurol*. 2018;24(5, Neuroinfectious Disease):1370–96.
53. Weidauer S, Wagner M, Enkirch SJ, Hattingen E. CNS Infections in Immunoincompetent Patients: Neuroradiological and Clinical Features. *Clin Neuroradiol*. 2020;30(1):9–25.
 54. Kennedy PGE. An overview of viral infections of the nervous system in the immunosuppressed. *J Neurol* [Internet]. 2020;2(Cmv). Available from: <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10265-z>
 55. Miller KD, Schnell MJ, Rall GF. Keeping it in check: Chronic viral infection and antiviral immunity in the brain. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2016;17(12):766–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.140>
 56. Rhein J, Bahr NC, Hemmert AC, Cloud JL, Bellamkonda S, Oswald C, et al. Diagnostic performance of a multiplex PCR assay for meningitis in an HIV-infected population in Uganda. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2016;84(3):268–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.017>
 57. Yang R, Zhang H, Xiong Y, Gui X, Zhang Y, Deng L, et al. Molecular diagnosis of central nervous system opportunistic infections and mortality in HIV-infected adults in Central China. *AIDS Res Ther*. 2017;14(1):1–7.
 58. Gianella S, Massanella M, Wertheim JO, Smith DM. The Sordid Affair Between Human Herpesvirus and HIV. *J Infect Dis*. 2015;212(6):845–52.
 59. Bowen LN, Smith B, Reich D, Quezado M, Nath A. HIV-associated opportunistic CNS infections: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2016;12(11):662–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.149>
 60. Brandsma D, Bromberg JEC. Primary CNS lymphoma in HIV infection [Internet]. 1st ed. Vol. 152, *Handbook of Clinical Neurology*. Elsevier B.V.; 2018. 177–186 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63849-6.00014-1>
 61. Vidal LR, de Almeida SM, Cavalli BM, Dieckmann TG, Raboni SM, Salvador GLO, et al. Human adenovirus meningoencephalitis: a 3-years' overview. *J Neurovirol*. 2019;25(4):589–96.
 62. Rozenek DM. Inmunosenescencia. (4):15–20.
 63. Reviews IND. The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. 2016;84–91.
 64. Arruti M, Piñeiro L, Salicio Y, Cilla G, Goenaga M, López de Munain A. Incidence of varicella zoster virus infections of the central nervous system in the elderly: a large tertiary hospital-based series (2007–2014). *J Neurovirol*. 2017;23(3):451–9.
 65. Nagel MA, Gilden D. Neurological Complications of VZV Reactivation. *Curr Opin Neurol*. 2014;27(3):356–60.
 66. Precit MR, Yee R, Pandey U, Fahit M, Pool C, Naccache SN, et al. Cerebrospinal fluid findings are poor predictors of appropriate filmarray meningitis/encephalitis panel utilization in pediatric patients. *J Clin Microbiol*. 2020;58(3).

Anexo 1. Cuadro de operacionalización de las variables.

Objetivos específicos	Variable	Definición Conceptual	Dimensiones (variables contenidas en la definición conceptual)	Definición operacional	Indicadores	Nivel de medición
I. Determinar los principales signos y síntomas neurológicos que presentaron los pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos con meningitis o encefalitis de etiología viral, de la población es estudio.	Signos y síntomas neurológicos	Son las manifestaciones clínicas asociadas con la infección o el proceso inflamatorio en el Sistema Nervioso Central, que se expresan en el paciente.	Signos y síntomas neurológicos	Presencia o ausencia de signos y síntomas neurológicos al momento de la consulta anotados en el expediente.	Presente Ausente SR Sin respuesta	Nominal Cualitativa
II. Describir el perfil demográfico y clínico de la población en estudio.	Características demográficas y antecedentes patológicos.	Conjunto de características de la estructura de una población según las variables de cada persona.	Sexo	Género del paciente.	Masculino /Femenino	Nominal Categórica
			Edad	Años cumplidos a la fecha.	Número en años del paciente al momento del diagnóstico	Cuantitativa Continua
			Servicio de procedencia del paciente.	Servicio del HSJD del cual procede el paciente al momento	Servicio procedencia.	Nominal Categórica

				de la indicación del análisis de LCR.		
		Enfermedades que ha padecido el paciente desde la infancia hasta la actualidad.	Estado de competencia inmunológico.	<p>Capacidad del sistema inmune del individuo para responder ante un antígeno.</p> <p>Definiendo paciente inmunosupreso como aquel con cualquiera de estos padecimientos: Trasplante de órgano sólido o médula ósea.</p> <p>Paciente con tratamiento inmunosupresor como prednisolona. Nefropatas estadio IV-V, Hepatopatías Child Pugh B-C, Diabetes Mellitus tipo 2 no controlados con HbA1C mayor a 7%.</p> <p>Neoplasia hematológica o de tumores sólidos. Enfermedades reumatológicas como LES.</p> <p>Pacientes con VIH .</p>	Inmunosupresor e Inmunocompetente	Nominal Categórica

			Tipo de inmunosupresión.	Antecedente patológico indicado en el expediente.	<p>Trasplante de órgano sólido o medula ósea.</p> <p>Paciente con tratamiento inmunosupresor.</p> <p>Paciente Nefrópatas.</p> <p>Paciente Hepatopatas.</p> <p>Paciente con Diabetes Mellitus tipo 2 no controlados.</p> <p>Paciente con neoplasia hematológica o de tumores sólidos.</p> <p>Enfermedades reumatológicas.</p> <p>Pacientes con VIH.</p>	Categórica Nominal
III. Detallar la etiología viral de las meningitis y encefalitis detectadas por métodos moleculares, en el grupo de los pacientes	Etiología viral.	Determinación genética en base al ADN o ARN del virus presente en la muestra que se identifica por medio de distintos	Identificación viral.	Identificación del tipo de virus obtenido a partir de la prueba molecular aplicada en la muestra de LCR.	<p>Citomegalovirus</p> <p>Enterovirus</p> <p>Virus herpes simplex 1</p> <p>Virus herpes simplex 2</p>	Nominal Cualitativa

inmunosupresos y en el grupo de los inmunocompetentes , de la población es estudio.		métodos de diagnóstico de identificación viral.			<p>Herpes virus humano 6</p> <p>Herpes virus humano 7</p> <p>Parechovirus humano</p> <p>Virus varicela-zóster</p> <p>Virus Epstein-Barr</p> <p>Adenovirus humano</p> <p>Parvovirus B19</p>	
IV. Describir mediante indicadores estadísticos, el análisis de los hallazgos que se obtuvieron del LCR de los pacientes inmunosupresos e inmunocompetentes , con encefalitis o meningitis viral, detectada por métodos moleculares en el	Hallazgos bioquímicos y celulares del análisis del LCR.	Grupo de pruebas que analizan el líquido cefalorraquídeo o para ayudar a diagnosticar enfermedades y afecciones que afectan el cerebro y la médula espinal.	Glucosa en LCR.	Concentración de glucosa detectada en mg/dL en el análisis bioquímico del LCR.	Concentración en mg/dL de glucosa en LCR.	Continua Cuantitativa
			Proteínas en LCR.	Concentración de proteínas detectada en mg/dL en el análisis bioquímico del LCR.	Concentración en mg/dL de proteínas en LCR.	Continua Cuantitativa
			Leucocitos en LCR.	Conteo del total de leucocitos por mm ³ detectados en el LCR.	Conteo leucocitos en LCR	Continua Cuantitativa
			Diferencial leucocitario.	Porcentaje de cada tipo de leucocito presente en el LCR.	Diferencial leucocitario en LCR	Continua Cuantitativa

HSJD durante el período en estudio.			Globulinas en LCR.	Indica la presencia de globulinas detectadas en LCR	Presencia de globulinas en LCR	Continua Cuantitativa
			Eritrocitos en LCR.	Conteo del total de eritrocitos por mm ³ detectados en el LCR.	Número de eritrocitos contabilizados por mm ³ de LCR extraído.	Continua Cuantitativa
			Presión de apertura para líquido cefalorraquídeo.	Presión media del interior de la cavidad craneal.	Presión de entrada en cm de H ₂ O.	Continua Cuantitativa

Anexo 2. Hoja de recolección de datos.

Hoja de recolección de datos					
Estudio: <i>“Caracterización clínica y de los hallazgos en LCR, de pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos, con meningitis o encefalitis viral, diagnosticados por métodos moleculares en el Hospital San Juan de Dios, en el período de enero del 2018 a junio del 2020”.</i>					
Código paciente:			Fecha del diagnóstico:		
Datos demográficos del paciente					
Sexo: M () F ()			Edad (años):		
Servicio del HSJD en el que se atendió:					
Antecedentes patológicos relacionados con inmunosupresión					
Marcar con una equis si el paciente presenta historia de:		Trasplante de órgano sólido			
		Trasplante de médula ósea			
		Paciente con tratamiento inmunosupresor			
		Nefropatas estadio IV-V			
		Hepatopatas Child Pugh B-C			
		Diabetes Mellitus tipo 2 no controlados con HbA1C mayor a 7%.			
		Neoplasia hematológica o de tumores sólidos			
		Enfermedades reumatológicas			
Marcar si el paciente es inmunocompetente			Paciente inmunocompetente		
Aislamiento viral detectado por PCR-RT					
Técnica de detección utilizada: (marcar con equis)			Neuro 9 Fast Track		Film Array
Nombre del o los virus detectado(s):					

Signos y síntomas neurológicos al momento de la consulta

Marcar con una equis los signos y síntomas indicados al momento de la consulta:		Fiebre		Cefalea
		Vómito		Fotofobia
		Rigidez en el cuello y la espalda.		Somnolencia
		Confusión		Alteración del estado mental
		Convulsiones		Alteración del lenguaje
		Cambios de comportamiento.		Signos neurológicos focales.
		Debilidad Muscular		Otros

Hallazgos bioquímicos y celulares del LCR

Concentración en mg/dL de glucosa en LCR	
Concentración en mg/dL de proteínas en LCR	
Conteo leucocitos en LCR	
Diferencial leucocitario en LCR	
Presencia de globulinas en LCR	
Número de eritrocitos contabilizados por mm ³ de LCR extraído	
Presión de entrada en cm de H ₂ O.	

Anotar aquí si se encuentra alguna otra observación en particular.

Anexo 3. Metodología PCR Real Time Neuro 9. Fast Track Diagnostic

Principios del procedimiento

Método

Esta prueba es un proceso basado en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección de secuencias en muestras humanas.

En primer lugar, se extraen los ácidos nucleicos de los tipos de muestras indicados en el apartado Uso previsto, con la adición del control interno (IC). El eluato con los ácidos nucleicos purificados de los patógenos se añade a una mezcla maestra para activar la reacción de RT-PCR. La mezcla maestra contiene enzima, tampón, desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP), cebador sintético y sondas específicas para los patógenos diana. La ventaja de utilizar varios pares de cebadores/sondas en una única mezcla de reacción es detectar simultáneamente diferentes dianas en una reacción.

En presencia de la diana, los cebadores y las sondas se hibridarán con la secuencia específica y permitirán la amplificación por la polimerasa. Las diferentes sondas incluyen colorantes fluorescentes y desactivadores de fluorescencia en estrecha proximidad, lo que limita la fluorescencia emitida. Sin embargo, durante la amplificación, la polimerasa extiende la nueva cadena y degrada la sonda marcada con el colorante fluorescente, gracias a su actividad de exonucleasa. Esto separa el colorante fluorescente del inhibidor, lo que permite la emisión de la fluorescencia.

El nivel de fluorescencia aumenta mediante la generación de amplicones y es proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos del patógeno contenidos en la muestra. El termociclador en tiempo real notifica el aumento del nivel de fluorescencia como un valor de umbral del ciclo (Ct).

El ensayo utiliza el virus del mosaico del bromo (BMV) y citomegalovirus de ratón (MCMV) como control interno (IC), que se introduce en cada muestra y en el control negativo (NC) durante el proceso de extracción. El tubo de IC suministrado con el kit contiene las distintas dianas utilizadas como IC por la ACE PP Mix, Vesic PP Mix y EPA PP Mix. El IC se extrae, se procesa y se amplifica simultáneamente con cada muestra, con el fin de monitorizar el proceso completo y poder identificar la inhibición de la PCR.

El NC también se procesa como una muestra (extracción y RT-PCR) y confirma la ausencia de contaminación.

El kit contiene también un control positivo (PC), que se añade a cada análisis de RT-PCR. El PC monitoriza el proceso de RT-PCR y el rendimiento de los cebadores y las sondas.

Preparación de la PCR en tiempo real

Para preparar el experimento:

1. Antes de usarlos, los reactivos deben descongelarse por completo, mezclarse (mediante agitación breve en vórtex) y centrifugarse brevemente.

Excepción:

- La enzima para RT-PCR 25x debe conservarse entre -30 °C y -10 °C, o en un bloque de enfriamiento en todo momento.

PC: Descongele el PC y consérvelo a temperatura ambiente (de 15 °C a 30 °C) durante 20–30 minutos. Agite bien el PC en un mezclador vórtex antes de usarlo.

2. Prepare un tubo aparte de 1,5 ml para cada mezcla de cebador y sonda, y etiquételo debidamente. Pipetee la cantidad necesaria de tampón para RT-PCR 2x en función del número de reacciones.

3. Pipetee la cantidad necesaria de ACE PP Mix, Vesic PP Mix, EPA PP Mix y HHV/B19 PP Mix en el tubo correspondiente que contiene tampón para RT-PCR 2x (consulte la Tabla 3).

4. Preparación de la mezcla maestra

NOTAS:

- Con el fin de obtener volúmenes adecuados y evitar que se desperdicie material, no sumerja la punta completa en el líquido cuando pipetee la enzima para RT-PCR 25x.
- Pipetee el líquido muy lentamente para evitar burbujas de aire.
- Antes de dispensar el líquido, limpie la punta contra el borde del recipiente para eliminar el exceso de líquido del exterior de la punta.
- Cambie la punta después de cada paso de pipeteo.

Mix:

a. Pipetee la cantidad necesaria de enzima para RT-PCR 25x en cada tubo que contenga

ACE PP Mix, Vesic PP Mix, EPA PP Mix, HHV/B19 PP Mix y tampón para RT-PCR 2x

(consulte la Tabla 3).

b. Agite brevemente la mezcla maestra en un mezclador vórtex y centrifúguela.

c. Utilice la mezcla maestra de inmediato y no la guarde después de su uso.

1. Pipetee 15 µl de cada mezcla en los pocillos identificados a continuación:

a. Mezcla maestra ACE en los pocillos A1 al H1.

b. Mezcla maestra Vesic en los pocillos A2 al H2.

c. Mezcla maestra EPA en los pocillos A3 al H3.

d. Mezcla maestra HHV/B19 en los pocillos A4 al H4.

2. Añada 10 µl de las muestras extraídas a los pocillos A1 al F1, A2 al F2, A3 al F3 y A4 al F4.

3. Añada 10 µl del PC a los pocillos G1 al G4.

4. Añada 10 µl del NC extraído a los pocillos H1 al H4.

5. Selle la placa con la película adhesiva adecuada.

6. Agite suavemente la placa en un mezclador vórtex y después centrifugue brevemente.

7. Coloque la placa en el Applied Biosystems® 7500.

NOTA: Consulte las instrucciones de uso del fabricante del Applied Biosystems® 7500.

Anexo 4. Metodología Film Array, Biofire para Meningitis.

FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) Panel

The FilmArray Meningitis/Encephalitis (ME) Panel is a qualitative multiplexed nucleic acid-based *in vitro* diagnostic test intended for use with FilmArray and FilmArray 2.0 systems. The FilmArray ME Panel is capable of simultaneous detection and identification of multiple bacterial, viral, and yeast nucleic acids directly from cerebrospinal fluid (CSF) specimens obtained via lumbar puncture from individuals with signs and/or symptoms of meningitis and/or encephalitis. The following organisms are identified using the FilmArray ME Panel:

Bacteria:

- *_Escherichia coli* K1
- *_Haemophilus influenzae*
- *_Listeria monocytogenes*
- *_Neisseria meningitidis* (encapsulated)
- *_Streptococcus agalactiae*
- *_Streptococcus pneumoniae*

Viruses:

- *_Cytomegalovirus*
- *_Enterovirus*
- *_Herpes simplex virus 1*
- *_Herpes simplex virus 2*
- *_Human herpesvirus 6*
- *_Human parechovirus*
- *_Varicella zoster virus*

Yeast:

- *_Cryptococcus neoformans/gattii*

The FilmArray ME Panel is indicated as an aid in the diagnosis of specific agents of meningitis and/or encephalitis and results are meant to be used in conjunction with other clinical,

epidemiological, and laboratory data. Results from the FilmArray ME Panel are not intended to be used as the sole basis for diagnosis, treatment, or other patient management decisions. Positive results do not rule out co-infection with organisms not included in the FilmArray ME Panel. The agent detected may not be the definite cause of the disease. Negative results do not preclude central nervous system (CNS) infection. Not all agents of CNS infection are detected by this test and sensitivity in clinical use may differ from that described in the package insert.

The FilmArray ME Panel is not intended for testing of specimens collected from indwelling CNS medical devices.

The FilmArray ME Panel testing is intended to be used in conjunction with standard of care culturer organism recovery, serotyping, and antimicrobial susceptibility testing.

Principle of the Procedure

The FilmArray ME pouch is a closed system disposable that houses all the chemistry required to isolate, amplify and detect nucleic acid from multiple meningitis and encephalitis pathogens within a single CSF specimen obtained from a lumbar puncture. The rigid plastic component (fitment) of the FilmArray ME pouch contains reagents in freeze-dried form. The flexible plastic portion of the pouch is divided into discrete segments (blisters) where the required chemical processes are carried out. The user of the FilmArray ME Panel loads the sample into the FilmArray ME pouch, places the pouch into the FilmArray instrument, and starts the run. All other operations are automated.

The following is an overview of the testing procedure:

1. Remove the FilmArray pouch from its vacuum-sealed package. Since solutions are drawn into the FilmArray ME pouch by vacuum, it is important to keep pouches in their protective packaging until the time of use.
2. Place the FilmArray ME pouch into the FilmArray Pouch Loading Station. The FilmArray Pouch Loading Station has been designed to prevent error by providing instructions and visual cues in the form of color-coded arrows to ensure that the pouch is properly loaded.
3. Load Hydration Solution into the FilmArray ME pouch using the Hydration Injection Vial. The vial is fitted with a blunt stainless steel cannula, which is used to deliver the solution into the pouch. Loading the pouch with Hydration Solution rehydrates the freeze-dried reagents contained in the pouch fitment.
4. Squeeze Sample Buffer ampoule to deliver contents into Sample Injection Vial and add CSF specimen using Transfer Pipette. Tightly close the lid of the Sample Injection Vial and invert to mix. The Sample Buffer contains reagents that promote binding of nucleic acids to magnetic beads for isolation.
5. Load the sample/buffer mixture into the FilmArray ME pouch using the Sample Injection Vial. When the sample mixture is loaded, a process control contained in the fitment of the pouch is

introduced into the sample. The process control monitors all of the critical processes that occur in the pouch.

6. Transfer the pouch to the instrument and initiate a run. The FilmArray software provides on-screen animations illustrating the steps needed to start the run.

7. View results on the test report at the completion of the run.

Anexo 5. Hoja de aval CEC, HSJD



Hospital San Juan de Dios
DIRECCIÓN GENERAL
COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

175 HOSPITAL
San Juan
de Dios

29 de setiembre del 2020
HSJD-122-CEC-2020

Señores
CONIS
Ministerio de Salud

**ASUNTO: SOLICITUD DE REGISTRO PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

Estimados Señores:

En Sesión Extraordinaria CEC-HSJD #019-2020, celebrada el 27 de agosto del 2020, se aprobó el Protocolo de Investigación N° 09-2020: "*Caracterización clínica y de los hallazgos en LCR, de pacientes inmunocompetentes e inmunosupresos, con meningitis o encefalitis viral, diagnosticados por métodos moleculares en el Hospital San Juan de Dios, en el periodo de enero del 2018 a junio del 2020*". Investigador principal: Dra. Silvia Araya Segura. Por lo cual se solicita el registro de la nueva investigación ante el CONIS.

Se indica como medio para la recepción de notificaciones el correo: rgutierc@ccss.sa.cr o al dmzumbad@ccss.sa.cr y/o al teléfono 2547-8216.

Sin más por el momento,

Atentamente,

COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS

Dr. Ronald Gutiérrez Cerdas
Presidente



📁 Archivo
RGC/dmzumbad